Aus dem Physiologischen Institut der Universität Würzburg
Direktor : Prof. Dr. med. E. Bauereisen

EINFLUSS DER EXTRAZELLULÄREN CHLORIDREDUKTION AUF MEMBRANPOTENTIAL UND INTRAZELLULÄRES KALIUM AM ZWERCHFELL DER RATTE

Inaugural - Dissertation

verfaßt und der Hohen Medizinischen Fakultät

der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

zur

Erlangung der medizinischen Doktorwürde

vorgelegt von

Peter Elsner
aus Bad Mergentheim

Würzburg, den 15. Mai 1981

Aus dem Physiologischen Institut der Universität Würzburg
Direktor: Prof. Dr. med. E. Bauereisen

EINFLUSS DER EXTRAZELLULÄREN CHLORIDREDUKTION AUF MEMBRANPOTENTIAL UND INTRAZELLULÄRES KALIUM AM ZWERCHFELL DER RATTE

Inaugural - Dissertation

verfaßt und der Hohen Medizinischen Fakultät
der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde

vorgelegt von
Peter Elsner
aus Bad Mergentheim

Würzburg, den 15. Mai 1981

Referent :	Professor Dr. med. W. Westphal
Korreferent :	Professor Dr. med. E. Bauereisen
Dekan :	Professor Dr. med. K.-H. Wulf

Tag der mündlichen Prüfung : 2.7.1981

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Universität Würzburg

Meiner Frau und meinen Eltern

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41543512_0021

INHALTSVERZEICHNIS

		Seite
	ABKÜRZUNGEN UND SYMBOLE	1
1.	EINLEITUNG	3
2.	FRAGESTELLUNG	6
3.	METHODIK	7
3.1.	Versuchstiere	7
3.2.	Anästhesie und Präparatentnahme	7
3.3.	Lösungen	9
3.4.	Versuchsanordnung	9
3.4.1.	Mechanische Versuchsanordnung	9
3.4.2.	Elektrische Versuchsanordnung	11
3.5.	Lösungsdurchfluß durch das Experimentierbad	13
3.6.	Herstellung der Mikroelektroden	14
3.6.1.	Herstellung der konventionellen Mikroelektroden	14
3.6.2.	Herstellung der ionenselektiven Mikroelektroden	14
3.7.	Ablauf der Versuche	18
3.7.1.	Versuche mit kontinuierlicher Registrierung des Membranpotentials	18
3.7.2.	Versuche mit der K^+-selektiven Mikroelektrode	20
3.8.	Auswertung der Versuche mit kontinuierlicher Registrierung des Membranpotentials	22
3.8.1.	Allgemeines	22
3.8.2.	Ermittlung der Höhe der Potentialveränderungen	22
3.8.3.	Bestimmung der Zeitkonstanten der Hyper- bzw. Depolarisationen	22
3.9.	Methode der ionenselektiven Messungen	24
3.10.	Ermittlung und Kontrolle der Selektivität der K^+-Elektroden	28
3.11.	Berechnung des Kalium- und Chloridpotentials der Zelle	31
3.12.	Statistik	33

		Seite
4.	ERGEBNISSE	34
4.1.	Einfluß der extrazellulären Chloridaktivität auf das Membranpotential	34
4.2.	Einfluß der Temperatur auf das Membranpotential und seine Veränderungen	36
4.3.	Das Verhalten der intrazellulären Kaliumaktivität und des Kalium-Potentials bei der extrazellulären Chloridreduktion	42
4.3.1.	Hypothesen über den vorliegenden Mechanismus	42
4.3.2.	Ionenselektive Messungen mit der Kalium-Flüssigionenaustauscher-Elektrode	44
5.	DISKUSSION	48
5.1.	Methodenkritik und Fehlerquellen	48
5.1.1.	Messungen in vitro	48
5.1.2.	Problematik der Experimente mit kontinuierlicher Registrierung des Membranpotentials	48
5.1.2.1.	Selektion von Fasern	48
5.1.2.2.	Einfluß eines "Liquid-Junction-Potentials" auf den Potentialverlauf	49
5.1.3.	Problematik der Experimente mit der K^+-selektiven Mikroelektrode	50
5.1.3.1.	Selektion von Fasern	50
5.1.3.2.	Mögliche Beeinflussung der Ergebnisse durch unterschiedlich reagierende Faserpopulationen	50
5.2.	Vergleich der Ergebnisse mit der Literatur	54
5.2.1.	Reaktion des Membranpotentials auf die Reduktion des extrazellulären Chlorids	54
5.2.2.	Versuch einer Erklärung der Divergenzen zwischen Literaturangaben und eigenen Ergebnissen	59

Seite

5.2.3. Reaktion der intrazellulären Kaliumaktivität auf die Chloridreduktion 61
5.3. Ionentransportmechanismen an der Zellmembran 62
5.3.1. Argumente für die Existenz einer Chloridpumpe am Rattenzwerchfell 62
5.3.2. Überlegungen zur Natur der Chloridpumpe 63
5.3.3. Einfluß einer elektrogenen Natriumpumpe und eines gekoppelten Natrium-Chlorid-Transports auf das Membranpotential 67
5.4. Aufgaben für die weitere Forschung 68

6. ZUSAMMENFASSUNG 69

LITERATURVERZEICHNIS I - VIII

ABKÜRZUNGEN UND SYMBOLE

1. Statistisch

$\bar{x}$	- Mittelwert
$s_{\bar{x}}$	- Standardabweichung des Mittelwerts
N	- Anzahl der Messungen
p	- Überschreitungswahrscheinlichkeit
$p > 0.05$	- Bei einem Vergleich zweier Stichproben können diese häufiger als 5 % der gleichen Grundgesamtheit entstammen. Ein sicherer Unterschied besteht nicht.
$p < 0.05$	- wahrscheinlicher Unterschied
$p < 0.01$	- sicherer Unterschied

2. Physikalisch

R	- Universelle Gaskonstante ($8.32 \cdot 10^7$ ergMol^{-1} grd^{-1})
T	- absolute Temperatur (grdK)
F	- FARADAY-Ladung (96 500 AsecÄq^{-1})
n	- Wertigkeit eines Ions
E_M	- Membranpotential der Zelle
E_K	- Kaliumpotential der Zelle
E_{Cl}	- Chloridpotential der Zelle
E_{Na}	- Natriumpotential der Zelle
a_K^o	- extrazelluläre Kaliumaktivität
a_K^i	- intrazelluläre Kaliumaktivität
a_{Cl}^o	- extrazelluläre Chloridaktivität
a_{Cl}^i	- intrazelluläre Chloridaktivität
P_K, P_{Na}	- Membranpermeabilität für Kalium, Natrium

$(K)_o$, $(K)_i$	- Kaliumkonzentration extrazellulär, intrazellulär
$(Na)_o$	- Natriumkonzentration extrazellulär
$(Na)_i$	- Natriumkonzentration intrazellulär

1. EINLEITUNG

Aufbauend auf der klassischen Arbeit von BOYLE und CONWAY (1941) vertraten HODGKIN und HOROWICZ (1959, 1960) aufgrund ihrer Experimente an der Skeletmuskelfaser des Froschs die Auffassung, das Ruhemembranpotential dieser Zelle könne beschrieben werden durch die Goldman-Hodgkin-Katz-Gleichung für Natrium und Kalium :

$$E_M = \frac{RT}{F} \ln \frac{P_K (K)_o + P_{Na} (Na)_o}{P_K (K)_i + P_{Na} (Na)_i} \quad . \qquad (1)$$

Eine Voraussetzung für die Anwendung dieser Gleichung war die Annahme, daß in der ruhenden Muskelfaser die Chlorid-Ionen im Sinne eines DONNAN-Gleichgewichtes passiv verteilt seien. Die Bestimmungen der intrazellulären Cl^--Konzentration durch ADRIAN (1961) bestätigten diese Auffassung.

Seit einigen Jahren sind jedoch Zweifel aufgetaucht. KERNAN et al. (1974), MACDERMOTT und KERNAN (1975) sowie ARMSTRONG et al. (1977) gelangten aufgrund ihrer Messungen der intrazellulären Chloridaktivität mit Hilfe neuentwickelter ionenselektiver Mikroelektroden zu der Überzeugung, daß in der Muskelzelle des Froschs mehr Chloridionen seien, als bei einer rein passiven Verteilung zu erwarten wäre. Demgegenüber fanden BOLTON und VAUGHAN-JONES (1977) und BAUMGARTEN und FOZZARD (1978) mit gleicher Methodik keine signifikanten Abweichungen von einer passiven Verteilung.

Für die Säugermuskulatur erschien eine nicht passive Chloridverteilung lange Zeit noch unwahrscheinlicher als für die Muskulatur der Amphibien, weil am Säugermuskel die Chloridleitfähigkeit einen sehr hohen Anteil der Gesamtleitfähigkeit der Membran ausmacht (PALADE und BARCHI, 1977 ; LORKOVIC und TOMANEK, 1977). Dennoch liegen ähnlich widersprüchliche Befunde, allerdings in geringerer

Zahl, über die Säugermuskulatur vor. Die jüngste Arbeit auf diesem Gebiet stammt von DULHUNTY (1978) und gab die Anregung zu der vorliegenden Untersuchung.

Nachdem DULHUNTY bereits 1977 aufgrund von Versuchen am M. sternomastoideus der Ratte einen wesentlichen Einfluß des Chlorids auf das Membranpotential postuliert hatte, vollzog sie in ihrer Arbeit von 1978 an verschiedenen Skeletmuskeln der Ratte und der Maus ein wichtiges Experiment von HODGKIN und HOROWICZ (1959) nach. Diese Autoren hatten in einer speziell dafür konstruierten Experimentierkammer in wenigen Sekunden die physiologische Badlösung abgesaugt und durch eine Lösung mit reduzierter Chloridkonzentration ersetzt. Während dieses Vorgangs wurde das Membranpotential einer Froschmuskelfaser kontinuierlich registriert. Es ergab sich eine rasche Depolarisation der Faser, der eine langsame Repolarisation auf den Ausgangswert folgte. Bei der Rückkehr in die physiologische Außenlösung zeigte sich das umgekehrte Bild.

DULHUNTYs Ergebnisse differierten von den beschriebenen Befunden am Froschmuskel erheblich: Sie sah am M. sternomastoideus der Ratte und an den Mm. extensor digitorum longus (EDL) und soleus der Maus bei extrazellulärer Chloridreduktion nach einer raschen Depolarisation eine dauerhafte Hyperpolarisation der Fasern. Als Ursache vermutete sie, daß die Fasern mehr Chlorid enthielten, als der passiven Verteilung entspräche.

Da PALADE und BARCHI (1977) unter ähnlichen Versuchsbedingungen an der Muskelfaser des Rattenzwerchfells keine dauerhafte Potentialveränderung beobachtet hatten, führte DULHUNTY auch ein Experiment an diesem Gewebe durch. Dabei fand sie bis auf die vorübergehende Depolarisation keine signifikante Veränderung des Membranpotentials. Sie schloß daraus, daß die innere Chlorid-Konzentration am Rattenzwerchfell nicht auf dieselbe Art und Weise kontrolliert werde wie an den anderen von ihr untersuchten Muskeln.

Da dies eine elektrophysiologische Sonderstellung des Diaphragmas

gegenüber der übrigen Skeletmuskulatur bedeuten würde, für die es ansonsten keinen Anhalt gibt, erschien es gerechtfertigt, diesen speziellen Befund einer genaueren Überprüfung zu unterziehen.

2. FRAGESTELLUNG

Es war das Ziel der vorgelegten Arbeit, die Versuche DULHUNTYs (1978) am Zwerchfell der Ratte nachzuvollziehen und auf ihre Reproduzierbarkeit zu überprüfen, das heißt, es sollte die Reaktion des Ruhemembranpotentials auf die Reduktion der extrazellulären Chlorid-Konzentration untersucht werden. Besondere Aufmerksamkeit fand der Einfluß der Temperatur auf das Potentialverhalten. Gleichzeitig sollte als zusätzlicher Parameter das Verhalten der mit ionenselektiven Mikroelektroden direkt bestimmten intrazellulären Kaliumaktivität unter den genannten experimentellen Bedingungen untersucht werden.

3. METHODIK

3.1. Versuchstiere

Als Versuchstiere wurden Wistarratten beiderlei Geschlechts aus dem Inzuchtstamm des Physiologischen Instituts der Universität Würzburg verwendet.
Für die Versuchsreihe bei 25 ^{o}C wurden 6 Tiere mit einem Durchschnittsgewicht von 127.5 $\pm$ 11.1 g (85 - 160 g) gebraucht. Für die Versuche bei 35^{o}C standen 5 Tiere mit einem mittleren Gewicht von 127.4 $\pm$ 14.9 g (65 - 160 g) zur Verfügung. Die Versuche mit der K^{+}-selektiven Elektrode wurden mit 13 Tieren, deren Gewicht im Mittel 157.7 $\pm$ 8.1 g (110 - 200 g) betrug, durchgeführt.
Die Auswahl der Tiere erfolgte zufällig ; auf das Geschlecht wurde keine Rücksicht genommen.

3.2. Anästhésie und Präparatentnahme

Die Tiere wurden in einem speziell für diesen Zweck konstruierten Käfig mit Äther "zur Narkose"/Hoechst narkotisiert. Nach Prüfung der Sensibilität wurden sie gewogen und durch einen Scherenschnitt dekapitiert und entblutet. Das Diaphragma wurde präpariert und einschließlich seiner ossären Fixationsstellen entnommen. Aus dem Präparat wurde in frontaler Schnittrichtung ein Streifen von etwa 1 cm Breite herausgetrennt und mittels eines Schnittes durch die Pars tendinosa halbiert. Dieser Zwerchfellstreifen wurde in der Experimentierkammer an beiden Enden mit Stecknadeln auf Blöcken aus Bienenwachs befestigt. Der mittlere Teil des Streifens lag über zwei Plexiglasbälkchen und wurde als Experimentierfläche genutzt.

Tabelle 1 : Verwendete Lösungen (Osm. = Osmolarität in mosm/l ; Konzentrationen in mmol/l, Ionenstärke in mmol/kg)

Lösung	Na	K	Ca	Cl	SO_4	HCO_3	HEPES	Saccha-rose	Ionen-stärke	Osm.	Mg	Glu-cose
A	150	3.5	2.5	160.5	-	-	1.0	-	165.0	330.5	1.0	12.0
AB	117	3.5	4.25	80.25	25.4	-	1.0	84.6	162.5	329.5	1.0	12.0

3.3. Lösungen

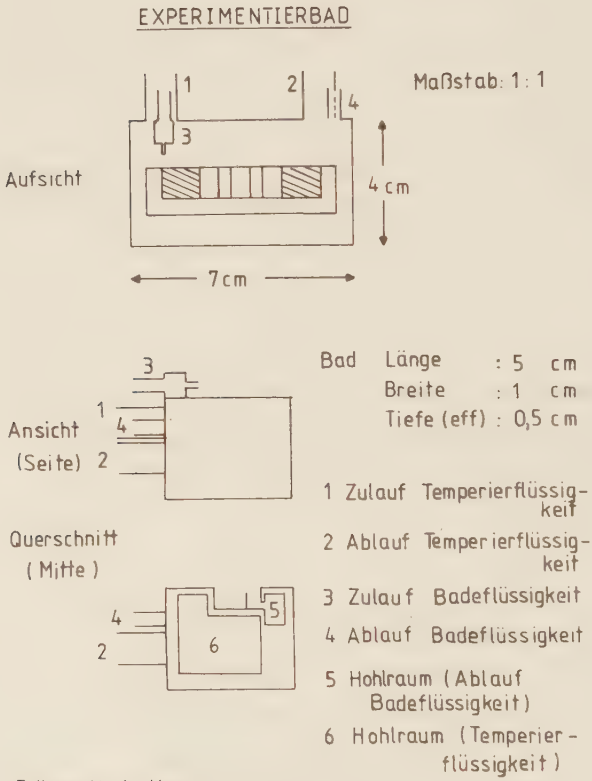
Aus der Fragestellung der Arbeit ergab sich die Notwendigkeit, die von DULHUNTY (1978) angegebenen Lösungen zu verwenden, um die Versuchsbedingungen vergleichbar zu halten. Als physiologische Ausgangslösung wurde ihre Lösung A benutzt, als Chlorid-reduzierte Lösung eine Mischung aus ihren Lösungen A und B (chloridfrei) zu gleichen Teilen (siehe Tab. 1). Diese im folgenden "Lösung AB" genannte Chlorid-reduzierte Lösung enthielt nur eine Konzentration von 80 mM Cl^-, genau die Hälfte der Lösung A. Das Chlorid wurde hier durch Sulfat ersetzt und die Isotonizität mit Saccharose hergestellt.
Bei Reduktion der äußeren Chloridkonzentration auf die Hälfte des physiologischen Wertes ist noch nicht mit spontanen Muskelzuckungen zu rechnen ; deshalb brauchte auch der Natrium-Kanal-Blocker Tetrodotoxin, den DULHUNTY verwendete, nicht zugefügt werden.
Die Lösungen wurden, wie von DULHUNTY angegeben, nur mit HEPES gepuffert. Anders als DULHUNTY durchgasten wir allerdings nicht mit einem Gemisch aus 95 % O_2 und 5 % CO_2, sondern mit reinem Sauerstoff. Der pH-Wert wurde auf pH 7.5 titriert.

3.4. Versuchsanordnung

3.4.1. Mechanische Versuchsanordnung

Das für die Durchführung dieser Arbeit konstruierte Experimentierbad (siehe Abb. 1) war auf dem Objekttisch eines binokularen Mikroskops der Fa. ERNST LEITZ, Wetzlar, befestigt.
Die Lösungen wurden in Plexiglasrohren, die in einen oben offenen Quader aus Plexiglas eingelassen waren, gespeichert. Von diesen Lösungsbehältern führten Silikonschläuche zu einem Mehrwegehahn, der modifiziert nach der Beschreibung von PARTRIDGE und THOMAS (1975) konstruiert war. Schließlich führte ein Schlauch von diesem Umschalthahn zum Bad. Die Badflüssigkeit floß über eine Trennwand in ein Überlaufbecken, aus dem sie abgesaugt wurde.

Abbildung 1 : Konstruktionszeichnung des für diese Arbeit verwendeten Experimentierbades

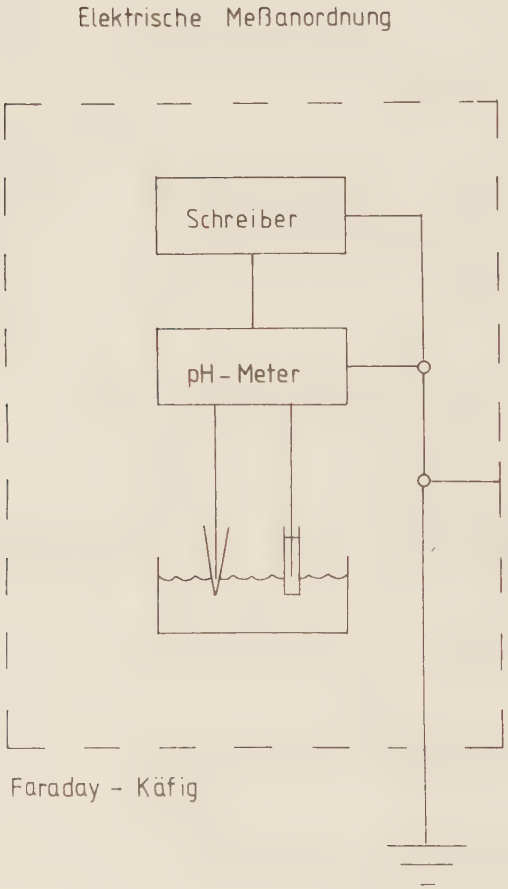


Um Versuche bei verschiedenen Temperaturen durchführen zu können, war eine gute Temperaturregulation der Badflüssigkeit vonnöten. Ein "Ultra-Thermostat" der Fa. COLORA heizte die Temperierflüssigkeit auf die gewählte Temperatur auf. Vom Thermostat aus wurde die Temperierflüssigkeit zunächst durch einen die Experimentierkammer umgebenden Hohlraum (siehe Abb. 1) gepumpt. Daran schloß sich der die Lösungsreservoire umgebende Temperierbehälter an. Durch einen Überlauf floß die abgekühlte Temperierflüssigkeit wieder in den Thermostaten zurück. Da die Schlauchführung zwischen den Reservoiren und dem Bad nicht wärmeisoliert war und die Lösungen deshalb etwas abkühlten, mußte die Thermostattemperatur höher als die gewünschte Badtemperatur eingestellt werden, um den Wärmeverlust auszugleichen. So war bei den 25 ^{o}C-Versuchen eine Reservoirtemperatur von 27 - 28^{o}C, bei den 35 ^{o}C-Versuchen eine Temperatur von 38 - 39^{o}C im Reservoir erforderlich. Die tatsächliche Temperatur in der Experimentierkammer wurde während der Versuche in regelmäßigen Abständen mit einem Thermo-Fühler kontrolliert.
Durchgast wurden die Lösungen in den Reservoiren über an ihren Enden mit Plexiglasstopfen verschlossene, mit einer Nadel fein durchlöcherte Silikonschläuche.

3.4.2. Elektrische Meßanordnung

Die elektrische Meßanordnung ist schematisch in der Abb. 2 dargestellt.
Als Meßelektrode diente entweder eine konventionelle Mikroelektrode oder eine K^{+}-selektive Mikroelektrode. Als Referenzelektroden wurden mit 3 M KCl-Agar-Agar gefüllte Kapillaren benutzt. Sowohl die Meß- als auch die Referenzelektrode waren an Mikromanipulatoren montiert. Über chlorierte Silberdrähte standen die Elektroden mit den Eingängen eines Digitalmeters "Digi 610" mit dem pH-Einschub "610 E" (Fa. WTW, Weilheim) in Verbindung. Dieses Voltmeter hat

Abbildung 2 : Schematische Darstellung der elektrischen Meßanordnung



einen Meßbereich von $\pm$ 1999 mV und weist nach Angaben des Herstellers einen Eingangswiderstand von ca. 10^{12} Ohm bei einem Meßfehler von $\pm$ 1 mV auf, was für eine stabile und praktisch fehlerfreie Anzeige auch bei den hochohmigen K^+-Elektroden ausreichte. An das Digital-Voltmeter war ein Kassettenschreiber "L 1060" der Fa. LINSEIS, Selb/Bayern, angeschlossen. So war eine kontinuierliche Potentialregistrierung möglich. Die gesamte Meßanordnung war in einem FARADAYschen Käfig gegen störende elektrische Felder abgeschirmt.

3.5. Lösungsdurchfluß durch das Experimentierbad

Die Dauer der Badperfusion wurde bei jedem Versuch registriert, nach Versuchsende die im Absaugbehälter aufgefangene Flüssigkeitsmenge gemessen und daraus die mittlere Durchflußgeschwindigkeit berechnet. Sie betrug für alle Versuche im Mittel 14.0 $\pm$ 2.1 ml (N = 24). Eine gewisse Schwankung der Durchlaufgeschwindigkeit während der einzelnen Versuche muß allerdings in Rechnung gestellt werden.

Um abschätzen zu können, wie lange nach dem Umschalten am Mehrwegehahn es zum Lösungswechsel in der Experimentierkammer kam, ist die Vorlaufstrecke zu berücksichtigen. Das innere Volumen des Schlauches zwischen Hahn und Bad betrug 4.0 ml, das Volumen des Bades 2.5 ml. Bei einem gesamten auszutauschenden Volumen von 6.5 ml und der genannten mittleren Durchflußgeschwindigkeit von 14 ml/min wäre also unter idealen Verhältnissen nach frühestens etwa 30 s mit einem Flüssigkeitsaustausch zu rechnen gewesen. Da aber der Lösungseinlaß in das Bad nicht im unmittelbaren Bereich der Meßelektrode angebracht werden konnte, um mechanische Irritationen der Fasern zu vermeiden ergab sich eine verlängerte Durchmischungszeit. Diesem Umstand entsprach, daß das Membranpotential auf den Lösungswechsel in der Regel erst nach etwa einer Minute reagierte. Die schnellen Potentialveränderungen, wie sie HODGKIN

und HOROWICZ (1959) sahen, wurden von uns deshalb nicht beobachtet. Die beschriebene Verzögerung des Lösungsaustauschs war jedoch nur bei den Messungen des Potentialverlaufs von Bedeutung, während die Messungen mit der ionenselektiven Elektrode im "steady state" durchgeführt wurden.

3.6. Herstellung der Mikroelektroden

3.6.1. Herstellung der konventionellen Mikroelektroden

Für die konventionellen Mikroelektroden wurden Kapillargläser aus Borosilikat (Fa. CLARK ELECTROMEDICAL INSTRUMENTS, Pangbourne/England, Cat. No. GC 1.5 OF-4) verwendet. Diese Kapillaren enthielten ein Glasfilament zur leichteren Füllung. Sie wurden an einem Puller (Vertical Pipette Puller Model 700 C, Fa. DAVID KOPF INSTRUMENTS) bei relativ hoher Temperatur und starkem Zug zu Mikropipetten gezogen. Auf diese Weise ließen sich sehr lange, feine Spitzen herstellen (siehe Abb. 3). Die Pipetten wurden vor Gebrauch kalt mit 3 M KCl-Lösung gefüllt.
Der Widerstand der Elektroden wurde gelegentlich überprüft ; es ergaben sich Werte zwischen 20 und 30 MOhm. Die Höhe der Spitzenpotentiale ("Tip-Potentials") wurde in Vorversuchen abgeschätzt. Es wurden dabei die mit den Elektroden gemessenen Potentiale in der Lösung A vor und nach Abbrechen der Spitzen verglichen ; die Differenzen betrugen maximal 3-4 mV.

3.6.2. Herstellung der ionenselektiven Mikroelektroden

Die K^+-selektiven Elektroden wurden nach der modifizierten Methode von WALKER (1971) hergestellt.
Für die Pipetten wurden filamentlose Kapillaren aus Pyrex-Glas

Abbildung 3 : Schemazeichnungen der konventionellen Mikroelektrode zur Messung des Membranpotentials (links) und der ionenselektiven Mikroelektrode (rechts).

(CORNING Code 7740) benutzt. Beim Ziehen der Mikropipetten wurden Exemplare mit kurzer "Schulter", aber dennoch feiner Spitze (unter 1 um) angestrebt (siehe Abb. 3). So geformte Pipetten ließen sich erstens leichter mit dem Ionenaustauscher füllen, und zweitens gelang es, die Austauschersäule relativ kurz zu halten, was den Elektrodenwiderstand deutlich reduzierte.

Das Pipettenglas ist wegen der polaren Silikat-Gruppen an der Oberfläche hydrophil. Deshalb hält es die hydrophobe organische Austauscherflüssigkeit nicht, und wenn doch, dann weicht die Austauscherflüssigkeit in die Mikropipette zurück, sobald die Spitze in eine wässrige Lösung taucht. Eine konstante, auswertbare Meßanzeige ist auf diese Weise nicht zu erhalten.

Es gilt demnach, die Innenseite der Pipettenspitze hydrophob zu machen. Dazu maskiert man die hydrophilen Silikat-Gruppen mit einem dünnen Silikonfilm. WALKER (1971) benutzte dafür Siliclad, während wir eine fünfprozentige Lösung von Dimethyldichlorosilan in Toluol verwendeten. Zur Silikonisierung wurde die Pipettenspitze 30 Sekunden lang in die Lösung gehalten. In dieser Zeit füllten sich etwa 0.2 - 0.3 mm der Spitze. Das Toluol verdunstete rasch, so daß nur das Silan auf der Glasoberfläche zurückblieb. Anschließend wurden die Pipetten über Nacht in einem Ofen bei 100 ^{O}C "gebacken". Dann konnten sie mit der Austauscherflüssigkeit (CORNING Code 477317) gefüllt werden. Zunächst wurde durch das weite Ende der Kapillare ein kleiner Tropfen des Ionenaustauschers möglichst weit nach vorn in die Pipettenspitze eingebracht. Sobald der Ionenaustauscher Kontakt mit der silikonisierten Wandfläche bekam, bewegte sich die Flüssigkeitssäule unter Verdrängung der Luft langsam zur Spitze. Anschließend wurde der hintere Raum der Mikropipette mit 0.5 M KCl-Lösung gefüllt.

Der Widerstand der Elektroden wurde größenordnungsmäßig mit einem FET-Voltmeter der Fa. KYORITSU bestimmt. Er lag am Ende des Meßbereichs zwischen 500 und 1000 MOhm und damit etwas unter

den von WALKER (1971) für seine Elektroden angegebenen Werten (10^9 - 10^{10} Ohm).

Dann wurden die Elektroden probeweise geeicht, um festzustellen, ob sie für einen Versuch geeignet waren. Es wurden nur solche Exemplare ausgewählt, die eine kurze Einstellzeit mit einer geringen Drift und einer möglichst idealen Steigung verbanden. Als Eichlösungen dienten 1, 10 und 100 mM KCl-Lösungen, deren Aktivitäten 1.0, 8.9 und 77.6 mM betrugen.

Nach der NERNSTschen Gleichung

$$E = \frac{RT}{F} \ln \frac{c_2}{c_1} \quad , \qquad (2)$$

wobei c_1 und c_2 für die Elektrolytkonzentrationen (respektive Elektrolytaktivitäten) auf den beiden Seiten einer semipermeablen Wand stehen, ist für eine zehnfache Konzentrations- bzw. Aktivitätsänderung eine konstante Veränderung des Potentials einer ionenselektiven Elektrode zu erwarten. Bei unseren Versuchsbedingungen (Kalibrierung bei Zimmertemperatur, 22 °C) ergibt sich ein theoretischer Wert von 58.6 mV für die zehnfache Aktivitätsänderung.

Tatsächlich lag die mit Hilfe der genannten Eichlösungen gemessene Steigung des Elektrodenpotentials bei den für Versuche verwendeten Elektroden bei 58.6 $\pm$ 0.6 mV (N = 26) für die zehnfache Aktivitätsänderung, wobei als niedrigster Wert 52.6 mV, als höchster Wert 64.0 mV gemessen wurden.

Um die Selektivität der Elektroden abschätzen zu können, wurde noch das Elektrodenpotential einer 10 mM NaCl-Lösung bestimmt. Ferner wurde das Potential der jeweils verwendeten Badlösung gemessen, um das Ausgangspotential für die intrazellulären Messungen zu kennen.

Die gesamte Kalibrierung der Elektroden wurde wegen der besseren Vergleichbarkeit der Werte bei Zimmertemperatur durchgeführt.

Abgesehen von der beschriebenen Probeeichung wurden die Elektro-

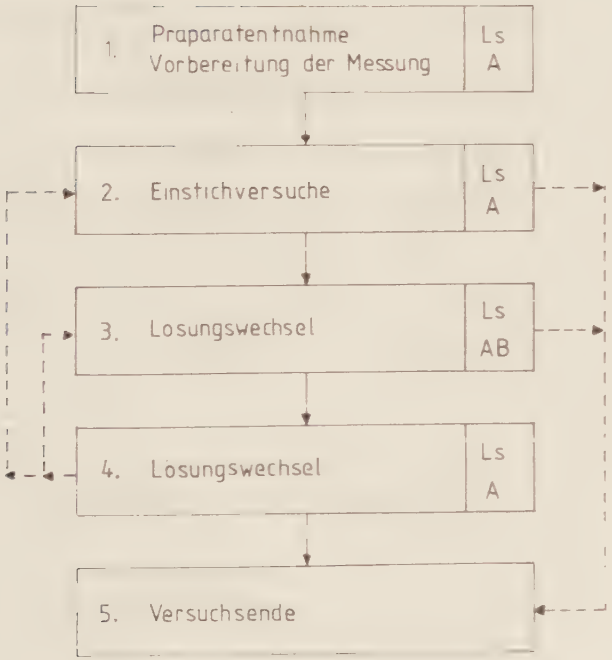
den vor und nach jeder Meßserie geeicht. Falls die Ergebnisse dieser Eichungen differierten, wurden für die Berechnung der Steigung der Eichgeraden und der intrazellulären K^+-Aktivität die Mittelwerte der beiden Eichungen verwendet.

3.7. Ablauf der Versuche

3.7.1. Versuche mit kontinuierlicher Registrierung des Membranpotentials

Um reproduzierbare Ergebnisse zu erhalten, wurden die Experimente nach einem festgelegten Plan durchgeführt (siehe Abb. 4).
Die Versuche begannen mit der Entnahme der Präparate und ihrem Transfer in das Bad. Dort wurden Elektroden und Beleuchtung eingerichtet und die Meßinstrumente nachreguliert. Diese Phase dauerte etwa 20 Minuten. Dann wurde versucht, in möglichst oberflächliche Muskelfasern des Präparats mit der Meßelektrode einzustechen und über mindestens 6 Minuten ein konstantes Membranpotential zu registrieren. Eine leichte Depolarisation des Faserpotentials unmittelbar nach dem Einstechen wurde hingenommen, wenn sie nicht mehr als 10 mV betrug und die absolute Höhe des Membranpotentials nicht unter 60 mV lag. Andernfalls wurde die Elektrode zurückgezogen und der Einstich in eine andere Faser versucht. - Dieser Versuchsabschnitt dauerte bis zu einer Stunde.
Falls die genannten Bedingungen erfüllt waren, konnte von der Lösung A, mit der der Versuch stets begonnen wurde, auf die Lösung AB umgeschaltet werden. Es wurde nun abgewartet, bis sich das Membranpotential auf einem neuen Niveau stabilisierte. Das dauerte bei einer Badtemperatur von 35 ^{o}C etwa 20 Minuten, bei 25 ^{o}C etwa 25 Minuten.
Nach Stabilisierung des Membranpotentials konnte auf die Ausgangslösung A zurückgewechselt werden. Bis das Membranpotential erneut einen stabilen Wert erreicht hatte, verstrichen wiederum etwa die genannten Zeiten. Danach konnte der Versuch beendet werden. -

Abbildung 4 : Schematische Darstellung des Versuchsablaufs bei der Arbeit mit der konventionellen Mikroelektrode.
Die durchgezogenen Pfeile markieren den festen Versuchsablauf ; die unterbrochenen Pfeile zeigen mögliche Variationen des Versuchsablaufs.



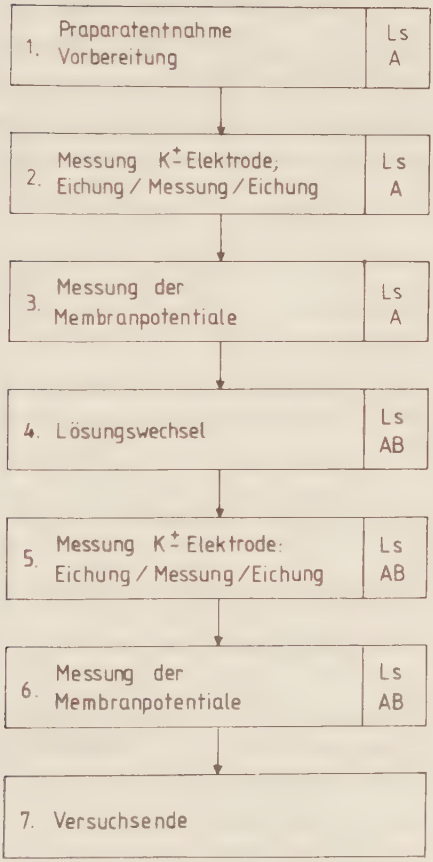
Von dem geschilderten Ablauf wurde allerdings gelegentlich abgewichen. Da es sich häufig als sehr schwierig erwies, eine Dauerregistrierung zu erhalten, wurden, falls die Elektrode gut lag, einzelne der beschriebenen Versuchsphasen wiederholt, um weitere Daten zu gewinnen. Andererseits kam es auch vor, daß ein Versuch schon vorzeitig abgebrochen werden mußte, weil die Elektrode nicht mehr in der Faser lag.

3.7.2. Versuche mit der K^+-selektiven Mikroelektrode

Bei diesen Versuchen wurde der in der Abb. 5 dargestellte Ablauf strikt eingehalten.
Die erste Phase (Präparatentnahme) verlief wie oben beschrieben.

Die Messungen mit der Kalium-Elektrode gliederten sich stets in die drei Abschnitte Eichung, eigentliche Messung und Eichung. Die Messungen dauerten jeweils etwa 20 Minuten. In dieser Zeit wurden im Mittel 13.0 ± 0.7 ($N = 26$) gelungene Einstiche registriert. Es folgte die Messung einer Reihe von Membranpotentialen mit der konventionellen Mikroelektrode aus demselben Faserfeld. Hier wurden in etwa 20 Minuten im Mittel 27.3 ± 1.5 ($N = 26$) erfolgreiche Messungen erreicht.
Danach wurde auf die Lösung AB umgeschaltet. Um sicher wieder bei stabilisiertem Membranpotential zu messen, wurde mindestens 30 Minuten abgewartet.
Die Messungen in der Lösung AB liefen wie die in der Lösung A ab. Anschließend wurden die Versuche beendet, ohne vorher noch einmal zur Lösung A zurückzuwechseln.

Abbildung 5 : Schematische Darstellung des Versuchsablaufs bei der Arbeit mit der K^+-selektiven Mikroelektrode. Der dargestellte Ablauf wurde strikt eingehalten ; insbesondere wurde keine Versuchsphase an demselben Präparat wiederholt.



3.8. Auswertung der Versuche mit kontinuierlicher Registrierung des Membranpotentials

3.8.1. Allgemeines

Zur Auswertung lagen die Originalregistrierungen des Schreibers vor. Es wurde zunächst überprüft, ob das Elektrodenpotential in der Außenlösung während des Versuchs konstant geblieben oder ob es gedriftet war. Eine Drift von bis zu 5 mV wurde hingenommen ; in diesem Fall wurden Ausgangs- und Endpotential mit einer Geraden verbunden in der Annahme, diese Drift sei gleichmäßig über die gesamte Versuchsdauer erfolgt. Von dieser Verbindungslinie zwischen Ausgangs- und Endpotential wurden nun im Abstand von jeweils einer Minute die Potentialwerte als Strecken abgelesen und in Millivolt umgerechnet.

3.8.2. Ermittlung der Höhe der Potentialveränderungen

Um die Größe der Depolarisationen und Hyperpolarisationen zu bestimmen, wurden die Potentialwerte unmittelbar vor dem Lösungswechsel und nach Erreichen des stabilen Endwertes herangezogen. Aus den Werten der Einzelversuche wurden die Mittelwerte und die Standardabweichungen der Mittelwerte berechnet.

3.8.3. Bestimmung der Zeitkonstanten der Hyper- bzw. Depolarisationen

Wie von HODGKIN und HOROWICZ (1959) erstmals beschrieben, zeigte sich auch bei unseren Versuchen auf eine Veränderung der extrazellulären Chloridaktivität eine rasche De- bzw. Hyperpolarisation, der dann eine langsame Repolarisation folgte.
Diese Repolarisation führte bei uns allerdings nicht zum Ausgangswert, sondern zu einer konstanten Hyper- bzw. Depolarisation. Die

Repolarisation hat einen annähernd exponentiellen Verlauf und kann daher mit einer Zeitkonstante beschrieben werden. Diese Zeitkonstante entspricht der Zeit, in der eine Größe auf das 1/e-fache ihres Ausgangswertes gesunken ist. Diesem Ausgangswert entsprach hier die Differenz zwischen dem Ausgangspotential E_o und dem Endpotential E_{end}.
Der Verlauf des Membranpotentials bei der langsamen Repolarisation werde hinreichend genau beschrieben durch die Exponentialgleichung

$$E_M = (E_o - E_{end}) \exp(-kt) + E_{end}. \qquad (3)$$

Wenn t gleich der Zeitkonstanten 1/k ist, dann wird der Exponent gleich -1 und E_M hat auf $(E_o - E_{end})/e + E_{end}$ abgenommen. Subtrahiert man auf beiden Seiten der Gleichung (3) E_{end} und logarithmiert anschließend, so ergibt sich

$$\ln(E_M - E_{end}) = \ln(E_o - E_{end}) - kt. \qquad (4)$$

Dies entspricht aber einer Geradengleichung der Form

$$y = a - bx . \qquad (5)$$

Aus den Originalregistrierungen des Membranpotentials wurden nun in Schritten von jeweils einer Minute die Wertepaare $(E_M - E_{end}, t)$ entnommen. Als Startpunkt t = 0 der Kurve galt der Zeitpunkt des Lösungswechsels, E_{end} war der Wert des stabilisierten Membranpotentials. Aus den Wertepaaren wurde in Regression von x auf y die Geradengleichung errechnet und aus der Steigung b = k der Kehrwert, die Zeitkonstante, gebildet.
Die obenstehenden Gleichungen (3) - (5) wurden für die Ermittlung der Zeitkonstanten von Depolarisationen benutzt. Um Hyperpolarisationen zu beschreiben, wurden statt der Differenzen $(E_M - E_{end})$ und $(E_o - E_{end})$ einfach deren Beträge eingesetzt.

3.9. Methode der ionenselektiven Messungen

WALKER und BROWN haben 1977 mehrere Verfahren der Ermittlung intrazellulärer "single ion activities" mit Hilfe ionenselektiver Elektroden beschrieben. In dieser Arbeit wurde die zweite der dort dargestellten Methoden angewandt. Diese Methode umfaßt die folgenden Schritte :

1. Eichung der ionenselektiven Elektrode in bekannten Standardlösungen ;
2. Messung des Potentials der ionenselektiven Elektrode in der Zelle ;
3. Messung des Membranpotentials und Subtraktion von 2. ;
4. Berechnung der intrazellulären Aktivität aus der Differenz im Elektrodenpotential zwischen Intrazellulär- und Extrazellulärraum, wobei die Badlösung als Bezugslösung dient.

In der Abb. 6 sind die bei dieser Methode auftretenden Meßsituationen schematisch dargestellt.

Dieses Verfahren hat den großen Vorteil, daß die gleichzeitige Anwesenheit von zwei Elektroden, nämlich der ionenselektiven und der Bezugselektrode, in einer Zelle nicht erforderlich ist. Voraussetzung für korrekte Ergebnisse ist allerdings, daß sich die Selektivität während der Messung nicht ändert.

Nach WALKER und BROWN (1977) setzt sich das Potential E_s, das an der intrazellulär messenden ionenselektiven Elektrode auftritt, aus dem Membranpotential E_M und dem Potential $E_{i,j}$, das auf die zu messenden Ionen I und die Störionen J zurückgeht, wie folgt zusammen :

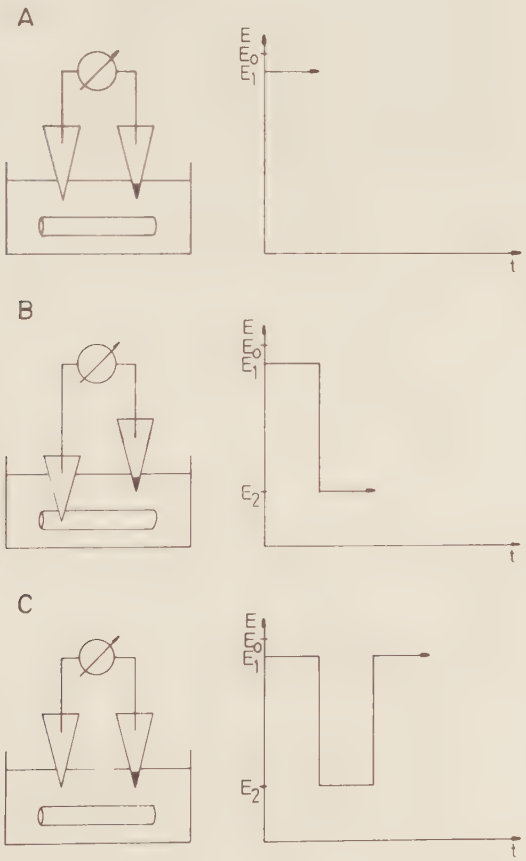
$$E_s = E_M - E_{i,j} \cdot \qquad (6)$$

Dabei gilt für $E_{i,j}$ nach NIKOLSKI (1937) :

$$E_{i,j} = \frac{nRT}{z_i F} \ln \frac{a_i^o + k_{i,j}\, a_j^o{}^{z_i/z_j}}{a_i^i + k_{i,j}\, a_j^i{}^{z_i/z_j}} \quad , \qquad (7)$$

Abbildung 6 : Meßsituationen und gemessene Potentiale bei der Arbeit mit der ionenselektiven Mikroelektrode.

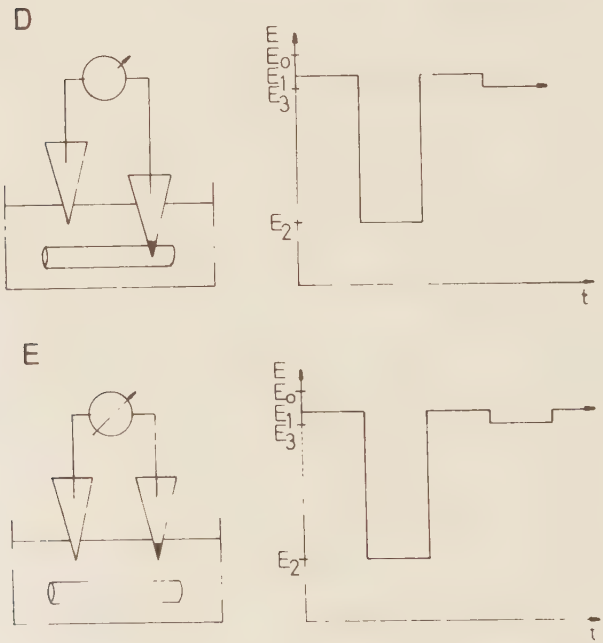
Die Zeichnung zeigt schematisch die Meßsituationen bei Verwendung einer K^+-selektiven (rechts, mit gefüllter Spitze) und einer konventionallen KCl-gefüllten (links) Mikroelektrode. Daneben jeweils die Schreiber-Anzeige.



wobei z_i bzw. z_j für die Ladung der Ionen I bzw. J und $k_{i,j}$ für den Selektivitätskoeffizienten I/J der Elektrode stehen. Bei n handelt es sich um eine Konstante, die die Steigung der Eichkurve beeinflußt.

A. Beide Elektroden befinden sich in der Badlösung, aber außerhalb der Muskelfaser. Die zwischen ihnen gemessene Potentialdifferenz E_1 hängt von der Kalium- und der Störionenaktivität der Lösung ab, wobei der Einfluß der Störionen von der Selektivität der K^+-Elektrode bestimmt wird. E_0 ist die in 1 M KCl-Lösung (Eichung) gemessene Potentialdifferenz.

B. Mit der konventionellen Mikroelektrode ist in die Faser eingestochen worden, während die K^+-Elektrode außen geblieben ist und als Bezugselektrode dient. Der Schreiber zeigt die neue Potentialdifferenz E_2 zwischen den Elektroden an. Die Differenz $E_1 - E_2$ entspricht dem Ruhemembranpotential E_M.



C. Zustand wie A.

D. Jetzt dient die KCl-gefüllte Mikroelektrode als Referenzelektrode, und die K^+-Elektrode liegt intrazellulär. Zwischen den Elektroden findet man die Potentialdifferenz E_3. Aus der Differenz E_0-E_3 kann noch nicht über die Eichkurve auf log a^i_K geschlossen werden, da das Potential der Kalium-Elektrode um das an ihr ebenfalls auftretende, entgegengerichtete Ruhemembranpotential vermindert ist. Zu E_0- E_3 wäre also noch E_M zu addieren.

E. Zustand wie unter A und C.

Da in unserem Fall Kalium das zu messende Ion ist und nur Natrium als interferierendes Ion in Frage kommt, kann man schreiben :

$$E_{K,Na} = \frac{RT}{F} \ln \frac{a^o_K + k_{K,Na}\ a^o_{Na}}{a^i_K + k_{K,Na}\ a^i_{Na}} \quad . \qquad (8)$$

Wegen der guten Selektivität der Elektrode für Kalium und der geringen intrazellulären Natrium-Aktivität gilt

$$k_{K,Na}\ a^i_{Na} \ll a^i_K \ , \qquad (9)$$

so daß der linke Term vernachlässigt werden kann. Nach Umformung erhält man dann die Gleichung

$$E_{K,Na} = (\frac{RT}{F} \ln(a^o_K + k_{K,Na}\ a^o_{Na})) - \frac{RT}{F} \ln a^i_K \quad . \qquad (10)$$

Der erste Term auf der rechten Seite entspricht nun genau der Potentialdifferenz zwischen der Badlösung und der Standardlösung mit der Kalium-Aktivität von 1. Diese Potentialdifferenz heiße E_0.
Setzt man die so vereinfachte Gleichung (10) in die Gleichung (6) ein, ergibt sich

$$E_s = E_M - E_0 + \frac{RT}{F} \ln a_K^i \quad . \qquad (11)$$

Nach weiterer Umformung und Delogarithmierung resultiert für die intrazelluläre Kaliumaktivität die Beziehung

$$a_K^i = \exp \left(\frac{E_s - E_M + E_0}{\frac{RT}{F}} \right) . \qquad x\,(12)$$

$\frac{RT}{F}$ ist hier die Steigung der Eichgeraden ; sie muß empirisch ermittelt werden.

Die Berechnung von a_K^i ist in der Abb. 7 beispielhaft an den Werten eines Original-Versuchs dargestellt.

Da, wie die Gleichung (12) zeigt, die errechnete Kaliumaktivität von den Meßwerten exponentiell abhängig ist, wirken sich schon kleine Fehler bei der Potentialmessung stark auf a_K^i und das daraus berechnete Kaliumpotential E_K aus. So erklärt sich die relativ große Standardabweichung des Mittelwerts in den Ergebnissen.

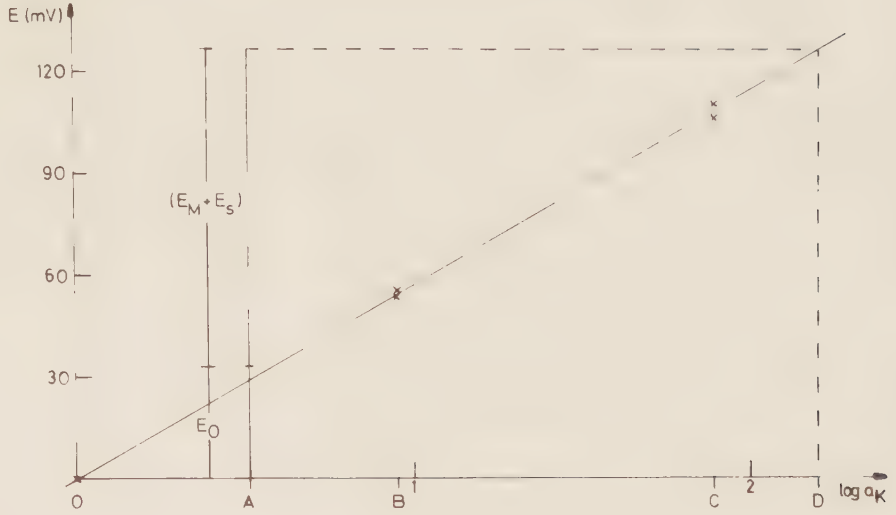
Die Werte der Aktivitätskoeffizienten für die Standard- und Versuchslösungen wurden aus den Ionenstärken nach dem bei NETTER (1959) beschriebenen Verfahren berechnet.

3.10. Ermittlung und Kontrolle der Selektivität der K^+-Elektroden

Wie oben erwähnt, war es für die in dieser Arbeit benutzte Methode der Ermittlung von a_K^i unabdingbare Voraussetzung, daß die Selektivität der Elektroden während der Versuche konstant blieb.

Nach Umformung der NIKOLSKI-Gleichung (7) läßt sich der Selektivitätskoeffizient $k_{K,Na}$ leicht aus der Potentialdifferenz in zwei Lösungen gleicher Ionenstärke, aber verschiedener K^+- bzw. Na^+-Aktivität berechnen. WALKER (1971) hat den Selektivitätskoeffizienten $k_{K,Na}$ der Kalium-Flüssigionenaustauscher-Mikroelektrode für eine

Abbildung 7 : Graphische Darstellung der Ermittlung der intrazellulären Kaliumaktivität aus den Meßwerten eines beispielhaften Versuches



Zu Abbildung 7

Die Potentiale der Eichungen (vor dem/nach dem Versuch) betrugen : 1 mM KCl (0 mV/ 0 mV) ; 10 mM KCl (54 mV/ 56 mV); 100 mM KCl (107 mV/111 mV); 10 mM NaCl (-23 mV/ -22 mV); Badlösung AB (33 mV/ 34 mV). Für E_M ergab sich 79.6 $\pm$ 1.0 mV (N = 46), für E_s 14.1 $\pm$ 1.6 mV (N = 13).

Die Logarithmen der Aktivitäten der Eichlösungen betragen für die 1 mM 0, für die 10 mM 0.05 und für die 100 mM 1.89. Nach dem Einsetzen dieser Werte in die Abszisse (Punkte 0, B, C) und der zugehörigen Potentiale in die Ordinate des Eichdiagramms erhält man nach der Methode der kleinsten Abweichungsquadrate eine Eichgerade, die durch den Ursprung verläuft und eine Steigung von 57.8 mV/zehnfache Aktivitätserhöhung hat. Da die Selektivität der Elektrode sich während der Messung praktisch nicht verändert hat (fast konstante Potentialdifferenzen zwischen 10 mM KCl und 10 mM NaCl) kann das im Text beschriebene Verfahren nach WALKER und BROWN (1977) angewandt werden. Es wird also die Summe aus E_0 (Badpotential minus Potential in 1 mM KCl), E_M und E_s gebildet. Dieser Betrag ist über dem Punkt A, dem log a_K der Badlösung, aufgetragen. Mit Hilfe der Eichgerade kann nun der zugehörige Logarithmus der Aktivität abgelesen werden. Dieser Wert beträgt 2.20 ; durch Delogarithmieren erhält man die innere Kaliumaktivität von 159 mM.

Ionenstärke von 100 mM mit 0,02 angegeben. Wir haben den Koeffizienten bei allen Eichungen aus der Potentialdifferenz zwischen 10 mM KCl- bzw. NaCl-Lösungen berechnet. Dabei wurden alle Elektroden verworfen, bei denen sich ein $k_{K,Na} > 0.04$ ergab ; ebenso wurden alle Experimente aus der Auswertung herausgenommen, bei denen sich der Selektivitätskoeffizient während des Versuchs um mehr als 0.01 verändert hatte.

3.11. Berechnung des Kalium- und Chloridpotentials der Zelle

An einer Membran, die nur für eine Ionenspezies permeabel ist, entwickelt sich bei Ungleichverteilung dieser Ionen in den durch die Membran getrennten Räumen ein elektrisches Potential, dessen Größe mit der bekannten NERNSTschen Gleichung berechnet werden kann.
Für die Kaliumionen an der Zellmembran beträgt dieses Kaliumpotential E_K

$$E_K = \frac{RT}{F} \ln \left(a_K^i / a_K^o \right) . \qquad (13)$$

Entsprechend ist das Chloridpotential definiert:

$$E_{Cl} = \frac{RT}{F} \ln \left(a_{Cl}^o / a_{Cl}^i \right) . \qquad (14)$$

Analoges gilt für das Natriumpotential E_{Na} . Alle aufgeführten Potentiale sind definitionsgemäß Diffusionspotentiale, die eine Gleichgewichtssituation voraussetzen, d.h. an der Membran darf kein Nettostrom fließen.
Wendet man das OHMsche Gesetz auf die Zellmembran an, so gilt für den Strom eines Ions der Ionensorte I (I_I) bei bekannter Spannung (U_I) und bekanntem Membranwiderstand für dieses Ion (R_I):

$$I_I = U_I / R_I . \qquad (15)$$

Setzt man für den Widerstand die Leitfähigkeit $g = 1/R$, so läßt sich schreiben

$$I_I = g_I \; U_I . \qquad (16)$$

Die Spannung als treibende Kraft des Stromes stellt aber die Differenz zwischen Membran- und Ionenpotential dar:

$$U_I = E_M - E_I . \qquad (17)$$

Eingesetzt in (16) ergibt sich dann

$$I_I = g_I (E_M - E_I). \tag{18}$$

Unter der Annahme, daß sich der Membranstrom nur aus dem Kalium-, dem Natrium- und dem Chloridstrom zusammensetzt, gilt für den Membranstrom I_M

$$I_M = I_K + I_{Na} + I_{Cl} . \tag{19}$$

Gemäß Gleichung (18) wird daraus

$$I_M = g_K (E_M - E_K) + g_{Na} (E_M - E_{Na}) + g_{Cl}(E_M - E_{Cl}) \tag{20}$$

und nach Umformen und Zusammenfassen

$$I_M = E_M (g_K + g_{Na} + g_{Cl}) - (g_K E_K + g_{Na} E_{Na} + g_{Cl} E_{Cl}). \tag{21}$$

Im Gleichgewichtszustand, in dem wir die Faser ja untersuchen, rechnen wir nun mit einem $I_M = 0$. Für diesen Fall wird aus (21) nach Umformen

$$E_M = \frac{g_K E_K + g_{Na} E_{Na} + g_{Cl} E_{Cl}}{g_K + g_{Na} + g_{Cl}} . \tag{22}$$

Da die Natriumleitfähigkeit im Vergleich zur Kalium- und Chloridleitfähigkeit im Ruhezustand der Faser sehr klein ist, kann sie vernachlässigt werden. Die Gleichung (22) vereinfacht sich demnach :

$$E_M = \frac{g_K E_K + g_{Cl} E_{Cl}}{g_K + g_{Cl}} . \tag{23}$$

Ausgehend von dieser Gleichung konnte E_{Cl} berechnet werden, da E_M als Meßwert vorlag, E_K nach Gleichung (13) aus dem ermittelten a_K^i und dem bekannten a_K^o berechnet werden konnte und sich für g_K und g_{Cl} am Rattenzwerchfell Werte in der Literatur fanden. Aus

E_{Cl} konnte dann nach der Gleichung (14) auch die intrazelluläre Chloridaktivität berechnet werden.

3.12. Statistik

Für alle Ergebnisse wurden der Mittelwert und der Standardfehler des Mittelwerts ($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$) berechnet ; diese sind auch angegeben.

An statistischen Tests fanden der STUDENT's-t-Test für verbundene und unverbundene Stichproben und der Chi^2-Test auf Normalverteilung der Daten (siehe 5.3.2.) Anwendung. Die Grenzwerte der Signifikanzniveaus wurden den statistischen Tafeln der Monographie von SACHS (1978) entnommen.

4. ERGEBNISSE

4.1. Einfluß der extrazellulären Chloridaktivität auf das Membranpotential

Die Abb. 8 zeigt die Nachzeichnung der Originalregistrierung eines typischen Versuchs aus der ersten Serie der Potentialverlaufsmessungen, die bei einer Badtemperatur von 25 °C durchgeführt wurden.

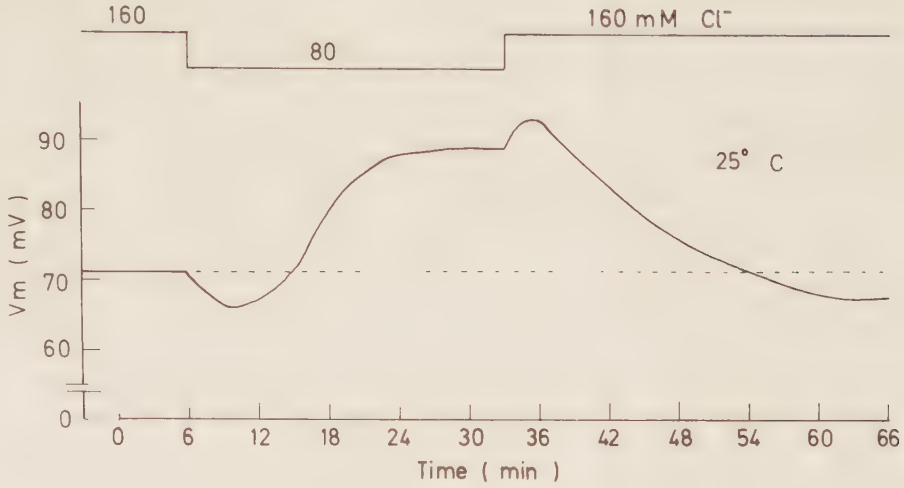
Bei der Reduktion der Chloridkonzentration in der Außenlösung von 160 mM auf die Hälfte kam es zunächst zu einer vorübergehenden Depolarisation. Dann erholte sich das Membranpotential aber rasch und stieg um über 15 mV an, um sich nach etwa 20 bis 25 Minuten auf diesem höheren Niveau völlig zu stabilisieren. Nun konnte auf die Ausgangslösung zurückgeschaltet werden. Diesmal sah man eine flüchtige Hyperpolarisation, die aber kürzer war als die passagere Depolarisation im ersten Teil des Versuchs. Dann depolarisierte die Faser und erreichte einen stabilen Potentialendwert, der etwas unter dem Ausgangswert lag.

Es handelt sich also bei der beschriebenen Reaktion des Membranpotentials um einen prinzipiell reversiblen Vorgang. In der Tat konnte das geschilderte Experiment an ein und derselben Faser bis zu dreimal wiederholt werden, ohne daß dabei wesentliche Änderungen im Potentialverlauf eintraten.

Dieser Reaktionsablauf fand sich bei sämtlichen Muskelfasern, die bei 25 °C untersucht wurden. Die Abb. 9 zeigt einen aus allen Versuchen gemittelten Potentialverlauf, getrennt nach der Reaktion auf die Halbierung der äußeren Chloridkonzentration und auf die Rückkehr zur Lösung A.

Die mittleren Membranpotentiale in der Ausgangslösung und nach Erreichen des stabilen Endwertes sind in der Tab. 2 aufgeführt. Die Differenz der Membranpotentiale vor und nach Chloridreduzierung, d.h. die mittlere Hyperpolarisation, beträgt demnach 16.2 mV, die

Abbildung 8 : Potentialverlauf bei einem typischen Experiment, durchgeführt bei 25 °C. Nachzeichnung einer Originalregistrierung.



mittlere Depolarisation 21.1 mV. Diese Potentialdifferenzen sind nach dem einseitigen t-Test hochsignifikant. Daß der Wert für die mittlere Depolarisation etwas größer ist als der für die mittlere Hyperpolarisation, dürfte daran liegen, daß die Fasern während der Versuche wohl konstant etwas depolarisierten, dies jedoch erst gegen Versuchsende sich in der Messung zeigte.
Dadurch ändert sich jedenfalls nichts an dem klaren Befund, daß alle untersuchten Muskelfasern stark hyperpolarisierten, wenn die Chloridkonzentration in der Außenlösung erniedrigt wurde.
Dabei kann es sich eigentlich nicht um einen nur passiven Vorgang handeln. Um nun den Einfluß der Temperatur auf dieses Phänomen näher studieren zu können und womöglich zu einer Aussage über den Charakter des zugrundeliegenden energetischen Prozesses zu gelangen, wurden die Versuche bei einer um 10 ^{o}C höheren Temperatur, nämlich bei 35 ^{o}C, unter sonst völlig identischen Bedingungen wiederholt.

4.2. Einfluß der Temperatur auf das Membranpotential und seine Veränderungen

In der Abb. 10 ist ein typischer Versuch bei einer Badtemperatur von 35 ^{o}C dargestellt.
Wieder sah man beim Lösungswechsel eine kurze Depolarisation, die allerdings in diesem Versuch deutlich stärker war als in dem vergleichbaren Experiment auf der Abb. 8. Dann hyperpolarisierte die Faser, ganz analog zu der Situation bei 25 ^{o}C. Diese Hyperpolarisation verlief aber jetzt deutlich schneller, und bereits etwa sechs Minuten nach dem Umschalten erreichte das Membranpotential sein Plateau.
Was beim Zurückschalten auf die Ausgangslösung ins Auge fällt, ist die Tatsache, daß die bei 25 ^{o}C regelmäßig beobachtete kurze Hyperpolarisation völlig fehlte. Vielmehr depolarisierte die Faser sofort nach dem Umschalten auf die Lösung A, und sie tat das wiederum

Abbildung 9 : Mittlerer Potentialverlauf der untersuchten Fasern bei 25 ^{o}C, getrennt nach Hyperpolarisation und nach Depolarisation. Die eingezeichneten Streuungen entsprechen den Standardfehlern der Mittelwerte.

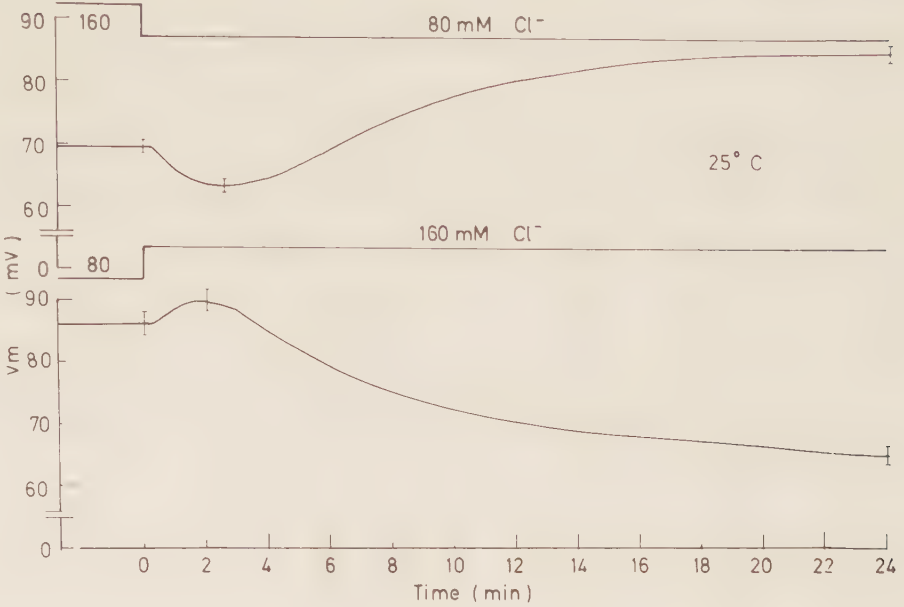


Tabelle 2 : Ergebnisse der Experimente mit kontinuierlicher Registrierung des Membranpotentials bei 25 und 35 °C.
Die Differenz der Ergebnisse bei den zwei Temperaturen wurde mit dem einseitigen t-Test für unverbundene Stichproben überprüft.

Übergang von Lösung A zu Lösung AB

Temperatur	E_M in A (mV)	E_M in AB (mV)	Zeitkonstante der Hyperpolarisation (min)
25 °C	69.5 ± 1.0 (N = 12)	85.7 ± 1.7 (N = 12)	5.4 ± 0.7 (N = 12)
35 °C	72.5 ± 3.4 (N = 9)	86.8 ± 2.2 (N = 9)	3.1 ± 0.3 (N = 8)
Differenz	3.0	1.1	2.3
t-Wert	0.955	0.402	2.560
	$p > 0.1$	$p > 0.25$	$p < 0.01$

Übergang von Lösung AB zu Lösung A

Temperatur	E_M in AB (mV)	E_M in A	Zeitkonstante der Depolarisation (min)
25 °C	86.6 ± 2.1 (N = 9)	65.4 ± 1.9 (N = 9)	5.9 ± 0.9 (N = 9)
35 °C	82.0 ± 1.9 (N = 10)	63.5 ± 3.4 (N = 10)	3.4 ± 0.4 (N = 9)
Differenz	4.6	1.9	2.5
t-Wert	1.629	0.473	2.539
	$p > 0.05$	$p > 0.25$	$p < 0.025$

deutlich schneller als bei 25 °C. Der nach etwa acht Minuten erreichte stabile Endwert lag auch hier um einige Millivolt unter dem Ausgangswert.

Analog zur Abb. 9 sind in der Abb. 11 die mittleren Registrierungen von Hyperpolarisationen und Depolarisationen dargestellt ; sie entsprechen den Beobachtungen am beschriebenen Einzelversuch in Bezug auf die etwas tiefere passagere Depolarisation beim ersten Lösungswechsel, das völlige Fehlen einer auch noch so kurzen oder noch so geringen Hyperpolarisation nach dem zweiten Lösungswechsel und die insgesamt beschleunigte Reaktion des Membranpotentials.

In der Tab. 2 finden sich die zu den beschriebenen Versuchen gehörenden Zahlenwerte ; sie bringt gleichzeitig den statistischen Vergleich der Versuchsergebnisse bei 25 und 35 °C.

Daraus läßt sich schließen :

1. Die bei den beiden Versuchsreihen gemessenen Membranpotentiale sind nicht signifikant verschieden. Die Temperatur hat also keinen nachweisbaren Einfluß auf die Höhe des Membranpotentials, und zwar weder unter normalen Versuchsbedingungen noch bei einer Chloridreduktion.
2. Es findet sich auch kein signifikanter Unterschied in der Höhe der passageren Depolarisationen. Dies liegt vor allem an der breiteren Streuung der Ergebnisse bei 35 °C.
3. Da bei 25 °C in allen Fällen, bei 35 °C jedoch nie eine passagere Hyperpolarisation beim Zurückwechseln auf die Lösung A auftrat, dürfte hier ein sicherer, temperaturbedingter Unterschied existieren.
4. Das wesentlichste Ergebnis ist jedoch, daß die Zeitkonstanten der Hyperpolarisation und der Depolarisation bei den beiden Temperaturen einen signifikanten Unterschied aufweisen. Das heißt, daß die Faser mit zunehmender Temperatur schneller hyperpolarisiert und depolarisiert.

Abbildung 10 : Potentialverlauf bei einem typischen Experiment, durchgeführt bei 35 °C.
Nachzeichnung einer Originalregistrierung.

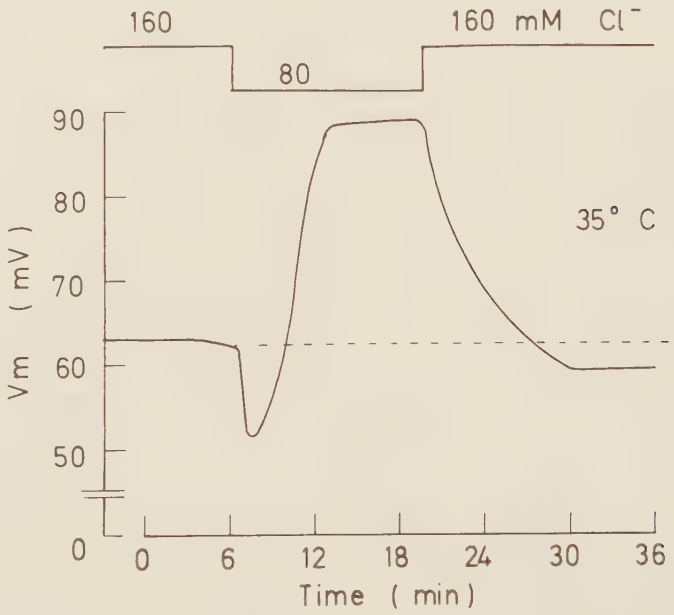
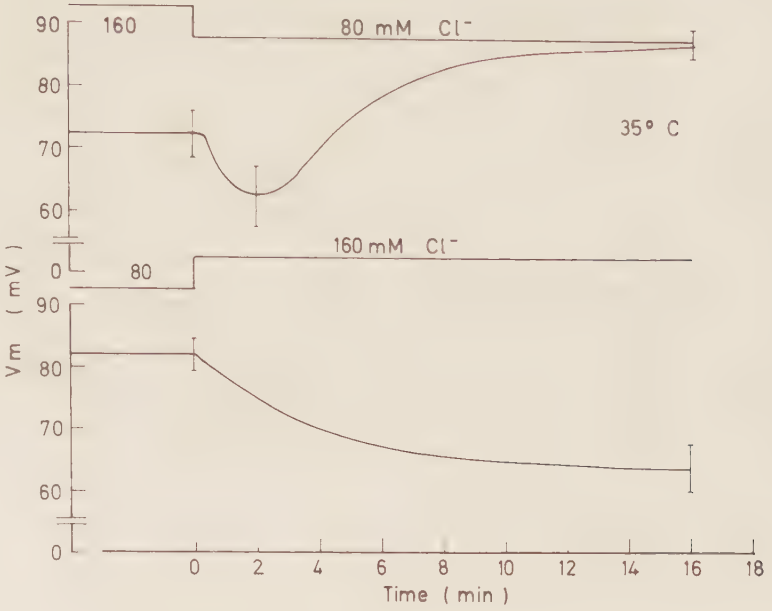


Abbildung 11 : Mittlerer Potentialverlauf der untersuchten Fasern bei 35 °C, getrennt nach Hyperpolarisation und nach Depolarisation. An den wesentlichen Kurvenpunkten sind die Standardfehler der Mittelwerte eingezeichnet.



Der Quotient der Zeitkonstanten ist der für eine Beurteilung des energetischen Charakters eines Transportvorgangs an der Membran wesentliche Q_{10}-Wert. Er liegt sowohl für die Hyperpolarisation wie für die Depolarisation bei 1.7. Damit ist er zwar größer als der bei rein passiven Vorgängen zu erwartende Wert von 1.03, der der Erhöhung der thermischen Energie entspräche, aber ist gleichzeitig kleiner als der für energieverbrauchende Transportvorgänge übliche Q_{10}-Wert von 2-3. Daraus läßt sich folgern, daß die Reaktion des Membranpotentials sicher nicht allein auf passiven Vorgängen beruht. Es könnte sich vielmehr um einen komplexen Mechanismus aus aktiven und passiven Vorgängen in der Membran handeln.
Durch die vorstehend beschriebenen Experimente konnte zwar eindeutig eine Veränderung des Ruhemembranpotentials bei Veränderung der extrazellulären Chloridkonzentration und ein Einfluß der Temperatur auf dieses Phänomen nachgewiesen werden. Unklar blieb jedoch, worauf die dargestellten Befunde nun im einzelnen zurückzuführen sind. Deshalb wurde versucht, durch Messungen mit ionenselektiven Elektroden der Lösung dieses Problems näherzukommen.

4.3. Das Verhalten der intrazellulären Kaliumaktivität und des Kalium-Potentials bei der extrazellulären Chloridreduktion

4.3.1. Hypothesen über den vorliegenden Mechanismus

Wenn die Gleichung

$$E_M = \frac{g_K E_K + g_{Cl} E_{Cl}}{g_K + g_{Cl}} \qquad (23)$$

das Ruhemembranpotential der Faser zutreffend beschreibt, dann kann die dauerhafte Erhöhung des Membranpotentials bei der extrazellulären Chloridreduktion nur durch folgende Hypothesen erklärt werden :

1. Das Chloridpotential E_{Cl} nimmt zu, weil sich die intrazelluläre Chloridaktivität bei Halbierung der äußeren um mehr als die Hälfte verringert.
2. Das Kaliumpotential E_K nimmt zu, weil sich bei gleichbleibender extrazellulärer Kaliumaktivität die intrazelluläre Kaliumaktivität erhöht.
3. Der depolarisierende Einfluß des Chloridpotentials nimmt ab, weil die Chloridleitfähigkeit g_{Cl} überproportional abnimmt.
4. Es besteht eine Kombination aus den genannten Ursachen.

Die erste Hypothese wurde von DULHUNTY (1978) vorgeschlagen und würde die Existenz eines aktiven Cl^--Transports mit depolarisierender Wirkung auf das Membranpotential voraussetzen. Um die Hyperpolarisation zu erklären, müßte man annehmen, daß dieser einwärtsgerichtete Transportmechanismus bei Reduktion des Substrats (Cl^-) im Außenmedium nur noch unteroptimal arbeiten könnte. Damit würde sich die Chloridaktivität innen dem passiven Verteilungswert nähern und E_M gegen E_K streben.
Die zweite Hypothese könnte beispielsweise für den Fall gelten, daß durch einen Abfall der äußeren Chloridaktivität die Kalium-Natrium-Pumpe stimuliert würde.
Die dritte Hypothese setzt wie die erste eine intrazelluläre Chloridakkumulation mit depolarisierendem Effekt voraus. Sie könnte dann zutreffen, wenn das substituierende Anion sich nicht inert verhalten, sondern die Chlorid-Kanäle der Membran selektiv blockieren würde. Um die Frage zu beantworten, welche Hypothese zutrifft, wäre eine gleichzeitige Messung der Variablen der Gleichung (23) (a^i_{Cl} , a^i_K , Leitfähigkeiten g_{Cl} und g_K) wünschenswert.

4.3.2. Ionenselektive Messungen mit der Kalium-Flüssigionenaustauscher-Elektrode

In der vorliegenden Arbeit wurde lediglich der Parameter a_K^i bestimmt. Werte für die Chlorid- und Kaliumleitfähigkeit der Zwerchfellfasern liegen in der Literatur bereits vor (RÜDEL und SENGES, 1972 ; PALADE und BARCHI, 1977). Da die Werte der letztgenannten Autoren unter vergleichbaren Versuchsbedingungen bestimmt wurden, fanden sie Verwendung. Mit ihrer Hilfe war es möglich, aus den gemessenen mittleren Membranpotentialen und den mittleren Kaliumaktivitäten die Chloridpotentiale und Chloridaktivitäten zu errechnen.

Die Ergebnisse sind in der Tab. 3 zusammengefaßt. Sie zeigen :

1. Das Ruhemembranpotential nimmt bei Reduktion des extrazellulären Chlorids signifikant zu. Dieser an vielen Zwerchfellfasern statistisch erhobene Befund deckt sich mit den oben beschriebenen Ergebnissen der Messungen an Einzelfasern. Allerdings liegt die hier gemessene mittlere Hyperpolarisation von 8.6 mV unter den an den Einzelfasern gemessenen 14.3 mV. Hier dürfte der Umstand eine Rolle spielen, daß die Einzelfasern wohl immer eine intakte Membran aufwiesen, weil an ihnen sonst keine Dauerregistrierungen möglich gewesen wären, während dies für die bei den Reihenmessungen angestochenen Fasern nicht mit Sicherheit behauptet werden kann.
2. Eine signifikante Erhöhung der intrazellulären Kaliumaktivität ist jedoch nicht festzustellen. Damit ergibt sich auch keine signifikante Änderung des aus dieser berechneten Kaliumpotentials. Folglich scheidet die Hypothese 2, die die Hyperpolarisation auf einen Anstieg des Kaliumpotentials zurückführte, aus.
3. Das Kaliumpotential der Fasern liegt um mehr als 20 mV über dem Membranpotential. Diese Differenz kann nur durch einen dem Kaliumpotential entgegenwirkenden, depolarisierenden Effekt eines anderen Potentials erklärt werden, für das nach Lage

Tabelle 3 : Ergebnisse von 13 Experimenten mit der K^+-selektiven Mikroelektrode bei 35 °C. Membranpotentiale und intrazelluläre Kaliumaktivitäten stellen Meßergebnisse dar, während Kalium- und Chloridpotentiale unter den im Text beschriebenen Prämissen errechnet wurden. Die Signifikanzprüfung erfolgte mit dem einseitigen t-Test für verbundene Stichproben. Zum Vergleich wurden die Ergebnisse der Verlaufsmessungen bei 35 °C als E'_M mit angeführt.

LÖSUNG	E_M (mV)	E'_M (mV)	a_K^i (mM)	E_K (mV)	E_{Cl} (mV)
A	73.2 ± 0.6 (N = 13)	72.5 ± 3.4 (N = 9)	130.2 ± 5.6 (N = 13)	104.6 ± 1.2 (N = 13)	68.6 ± 0.7 (N = 13)
B	81.8 ± 0.8 (N = 13)	86.8 ± 2.2 (N = 9)	141.5 ± 8.5 (N = 13)	106.4 ± 1.5 (N = 13)	73.1 ± 1.0 (N = 13)
Differenz	8.6	14.3	11.3	1.8	4.5
	t = 10.53	t = 3.53	t = 1.86	---	---
	$p < 0.0001$	$p < 0.01$	$p > 0.05$		

der Dinge nur das Chlorid-Potential in Frage kommt, das zu 88 % (PALADE und BARCHI, 1977) zum Membranpotential beiträgt. Das Chloridpotential muß also positiver sein als das Membranpotential, und das bedeutet nach Gleichung (14) eine höhere intrazelluläre Chloridaktivität als bei passiver Verteilung, bei der das Chloridpotential ja dem Membranpotential entspräche.

4. Damit ist die Entscheidung aber noch offen, welche der Hypothesen 1 und 3 oder ob beide (4) zutreffen. Um zu überprüfen, ob bei der Chlorid-Reduktion außen der innere Chloridüberschuß gegenüber der passiven Verteilung gleichmäßig abnimmt oder sich überproportional verringert, wurde der Quotient aus der errechneten intrazellulären Chloridaktivität und der bei einer DONNAN-Verteilung zu erwartenden inneren Chloridaktivität gebildet. Für die Lösung A ergab sich ein Wert von 3.96 ± 0.20 (N = 13), für die Lösung AB 3.62 ± 0.27 (N = 13). Das ergab aber keinen signifikanten Unterschied auf dem Niveau der 5 %igen Irrtumswahrscheinlichkeit. Damit ist eine Abnahme des Chloridüberschusses innen durch diese Versuche nicht erwiesen, und die Hypothese 1 kann nicht bestätigt werden. Festzuhalten bleibt aber, daß sich in beiden Lösungen 3.5 bis 4 mal mehr Chlorid in den Fasern befindet, als es einer passiven Verteilung entspräche.

So bleibt vorerst für die Erklärung der Hyperpolarisation nur die Hypothese 3, nämlich die überproportionale Abnahme der Chloridleitfähigkeit, übrig. Tatsächlich deckt sich das mit den bei PALADE und BARCHI (1977) angeführten Werten, obwohl die Autoren selbst diesen Sachverhalt nicht diskutierten, wohl weil sie keine Hyperpolarisation sahen.

In normaler Krebslösung betrug die von ihnen gemessene Gesamtleitfähigkeit der Membran 2.83 mS/cm^2 (100 %), bei völligem Chlorid-

entzug im Außenmedium nor noch 0.34 mS/cm^2 (12 %). Definitionsgemäß wurde diese Restleitfähigkeit als Kaliumleitfähigkeit bezeichnet, die Differenz zwischen ihr und der Gesamtleitfähigkeit der Membran als Chloridleitfähigkeit (2.49 mS/cm^2 entsprechend 88 %). Bei Reduktion des äußeren Chlorids auf die Hälfte sollte man nun erwarten, daß sich die Chloridleitfähigkeit auf die Hälfte, also 1.25 mS/cm^2 (44 %) verringerte. Dann sollte, bei konstanter Kaliumleitfähigkeit, die Gesamtleitfähigkeit 1.59 mS/cm^2 (56 %) betragen. Tatsächlich maßen die Autoren jedoch nur eine Gesamtleitfähigkeit von 1.34 mS/cm^2 (47 %). Das zwingt zu der Annahme, daß die Chloridleitfähigkeit nicht auf 50 %, sondern überproportional stark auf 40 % ihres Ausgangswertes abgesunken ist.

Dieses Verhalten der Chloridleitfähigkeit erklärt die in dieser Versuchsreihe beobachtete Hyperpolarisation von 8.6 mV hinreichend. Für die mittlere Hyperpolarisation der Einzelfasern von 14.3 mV reicht die Erklärung durch die Hypothese 3 allerdings nicht aus, wollte man nicht annehmen, daß die Chloridleitfähigkeit bereits praktisch auf Null gesunken wäre. Dafür gibt es aber keinen Hinweis. Hier dürfte doch zusätzlich eine Veränderung im Chloridpotential entsprechend der Hypothese 1 eine Rolle spielen, wie ja auch der genannte Q_{10}-Wert von 1.7 nahelegt.

5. DISKUSSION

5.1. Methodenkritik und Fehlerquellen

5.1.1. Messungen in vitro

Generell können Untersuchungen an Geweben in vitro nur Anhaltspunkte für deren Verhalten in vivo bieten. Insofern darf aus unseren Ergebnissen nicht ohne weiteres auf das Verhalten der Skeletmuskulatur der lebenden Ratte geschlossen werden. Diese Einschränkung wird deswegen besonders betont, weil MACCHIA et al. (1978) und MACCHIA und BAUMGARTEN (1979) nachweisen konnten, daß a^{i}_{Cl} beim M. semitendinosus des Frochs und der Kröte in vivo viel niedriger liegt, als es sich bei Messungen in vitro ergab. Ihre Untersuchungen mit Cl^--selektiven Elektroden ergaben in vivo - anders als in vitro - keine signifikanten Abweichungen der Chloridaktivität vom erwarteten Wert bei passiver Verteilung mehr. Andererseits wiesen die genannten Autoren darauf hin, daß wegen des niedrigen a^{i}_{Cl} schon kleine Meßfehler signifikante Effekte haben können und deshalb eine geringe Abweichung von der passiven Verteilung nicht auszuschließen sei.

5.1.2. Problematik der Experimente mit kontinuierlicher Registrierung des Membranpotentials

5.1.2.1. Selektion von Fasern

Da diese Versuche nur durchgeführt werden konnten, wenn die Elektrode sicher in einer Faser lag, was sich in einem stehenden Membranpotential ausdrückte, besteht die Möglichkeit, daß für die Versuche vor allem Fasern mit größerem Durchmesser selektiert wurden. Beim Vorliegen mehrerer Faserpopulationen im Diaphragma mit unterschiedlichen Eigenschaften könnte dies bedeuten, daß die Ergebnisse nur für einen bestimmten Fasertyp, nicht jedoch für "das Zwerchfell" gelten (siehe auch 5.1.3.).

5.1.2.2. Einfluß eines "Liquid-Junction-Potentials" auf den Potentialverlauf

HODGKIN und HOROWICZ (1959) beschrieben zuerst den typischen Potentialverlauf, nämlich die rasche Depolarisation und die langsame Repolarisation, der auftritt, wenn das extrazelluläre Chlorid durch ein impermeables Ion ersetzt wird. Dieses Phänomen wurde allgemein damit erklärt, daß bei einer Verminderung von a^o_{Cl} auch

$$E_{Cl} = \frac{RT}{F} \ln (a^o_{Cl} / a^i_{Cl}) \qquad (14)$$

abnehme und mithin auch E_M nach der Gleichung (23).
Allmählich nehme dann aber auch a^i_{Cl} ab und es stelle sich ein neues Gleichgewicht der Chloridaktivitäten auf beiden Seiten der Membran ein, so daß E_{Cl} und damit auch E_M wieder ihre Ausgangswerte erreichten.
SPITZER und WALKER (1979) wiesen nun auf die Möglichkeit hin, daß Depolarisation und Repolarisation auf einem "Liquid-Junction-Potential" beruhen könnten, das entsteht, wenn sich eine Grenzfläche zwischen Lösungen mit Ionen verschiedener Mobilität bildet. Die Potentialveränderungen wären demnach nicht auf Vorgänge an der Membran, sondern auf den Einfluß einer zurückgebliebenen Schicht der Badlösung direkt um die Faser und der neuen Lösung zurückzuführen.

Die Größenordnung des Potentials wurde von den erwähnten Autoren für eine Cl_o-Reduktion von 146.1 mM auf 51.3 mM mit 6-7 mV angegeben. Eine Berücksichtigung dieses Potentials und damit eine entsprechende Korrektur der Meßergebnisse ist nur für geometrisch übersichtliche Situationen möglich. Die komplexen geometrischen Verhältnisse eines Präparats wie des in dieser Arbeit benutzten lassen sich vorerst nicht erfassen.
Allerdings spielt dieses Entstehen und allmähliche Verschwinden eines "Liquid-Junction-Potentials" für die Interpretation der hier dargestellten Ergebnisse auch nur eine untergeordnete Rolle. Denn be-

troffen von diesem Potentialeinfluß wäre nur der Zeitabschnitt vom Lösungswechsel bis zu dem Zeitpunkt, da die Faser ihr Ausgangspotential wieder erreicht - die nachfolgende Hyperpolarisation oder Depolarisation kann damit nicht erklärt werden.
Es ist also nicht auszuschließen, daß die ermittelten Zeitkonstanten durch "Liquid-Junction-Potentials" im Sinne einer Verlängerung verfälscht sind. Das kann freilich nicht an der Tatsache rütteln, daß ein signifikanter Unterschied zwischen den Zeitkonstanten bei 25 ^{o}C und 35 ^{o}C festzustellen war. Wie jedoch das "Liquid-Junction-Potential" die Zeitkonstanten im einzelnen beeinflußte, ist nicht bekannt. Sollte es sich um einen Summationseffekt im Sinne einer konstanten Verlängerung handeln, dann wäre der ermittelte Q_{10} -Wert zu niedrig. Dafür spricht, daß der gefundene Wert von 1.7 wohl weit über dem thermodynamischen Wert, aber unter dem für aktive Transportvorgänge an der Membran zu erwartenden Wert liegt.

5.1.3. Problematik der Experimente mit der K^+-selektiven Mikroelektrode

5.1.3.1. Selektion von Fasern

An dieser Stelle ist der oben geäußerte Vorbehalt zu wiederholen, daß nämlich vor allem die Werte relativ "dicker" Fasern registriert wurden. Das träfe für die K^+-Elektroden umso eher zu, als ihre Spitzen gröber waren als die der konventionellen Mikroelektroden.

5.1.3.2. Mögliche Beeinflussung der Ergebnisse durch unterschiedlich reagierende Faserpopulationen

Die in dieser Arbeit angewandte Methode, aus einer Reihe von Einzelmessungen von E_M und E_2 Mittelwerte zu bilden und daraus ein mittleres a_K^i zu berechnen, setzt voraus, daß die Population der

Zwerchfellfasern nicht aus mehreren, elektrophysiologisch verschieden reagierenden Subpopulationen besteht.

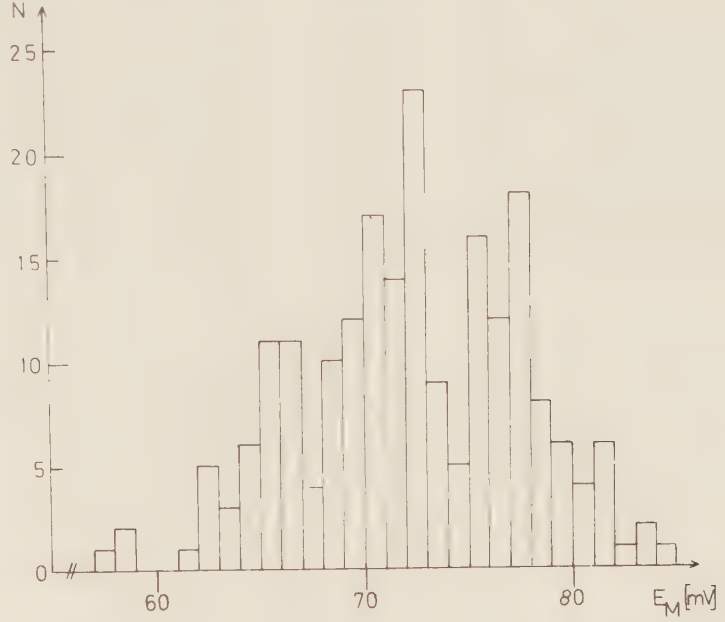
Nun sind zwar morphologische und histochemische Unterschiede der Zwerchfellfasern bekannt. So berichteten etwa ZOLOVICK et al. (1970) über drei Fasertypen, die sich in Größe und Ausstattung an oxidativen Enzymen und Myosin-ATPase deutlich unterschieden. Trotz dieser Unterschiede fanden die Autoren jedoch keine Unterschiede in den elektrophysiologisch bestimmten Membrankonstanten. In dieselbe Richtung weisen die Ergebnisse WESTPHALs (1966), der keine signifikanten Unterschiede zwischen den Membranpotentialen von Fasern tieferer Zwerchfellschichten und denen oberflächlicher Zellen finden konnte. Auch CREESE et al. (1968) sahen eine Normalverteilung der Membranpotentiale am Zwerchfell, was für ein einheitliches elektrophysiologisches Verhalten der verschiedenen Fasertypen spräche. PALADE und BARCHI (1977) verglichen Membraneigenschaften (insbesondere Membranwiderstand und Ionenleitfähigkeiten) derjenigen Zwerchfellfasern, die ein Membranpotential von mehr als 75 mV aufwiesen, mit denen der Gesamtpopulation ; auch sie fanden keine signifikanten Unterschiede.

Nun wurden die angeführten Ergebnisse allerdings an Präparaten gewonnen, die sich in einer mit 95 % O_2/5 % CO_2 perfundierten Badlösung befanden. Wir arbeiteten jedoch in einem Bikarbonat- und CO_2-freien Medium.

Deshalb erscheint für uns die Arbeit von AICKIN und THOMAS (1977) wichtig, in der am Rattenzwerchfell zwei Reaktionsweisen des Membranpotentials auf die Reduktion des äußeren CO_2 bei konstantem pH beschrieben wurden. Eine Gruppe von Fasern depolarisierte in diesem Fall deutlich stärker als die andere. Dieser Befund paßt zu der in der gleichen Arbeit veröffentlichten Beobachtung, daß die Membranpotentiale von "fast-twitch"-Fasern und von "slow-twitch"-Fasern bei gleichem Ausgangswert verschieden stark depolarisieren, wenn das extrazelluläre CO_2 reduziert wird. Obwohl der Befund gleicher Membran-

potentiale von Fasern roter und weißer Muskulatur in der Bikarbonat/CO_2-Lösung mit einem Fragezeichen versehen werden muß, da z. B. CAMPION (1974) und WAREHAM (1978) bereits unter diesen Bedingungen Differenzen in den Membranpotentialen sahen, ist die Beobachtung von AICKIN und THOMAS am Zwerchfell doch von unmittelbarer Relevanz für diese Arbeit. Freilich sind die Versuchsbedingungen nicht ganz vergleichbar, da die genannten Autoren zwar das CO_2 erniedrigten, aber immer noch Bikarbonat in ihrer Badlösung hatten, während wir in einem reinen O_2/HEPES-Medium arbeiteten.
Um zu überprüfen, ob auch unter unseren Bedingungen die zwei von AICKIN und THOMAS beschriebenen Fasertypen nachzuweisen waren, wurde eine Liste der jeweils 21 ersten Potentialmessungen von zehn Serienmessungen des Membranpotentials an verschiedenen Zwerchfellpräparaten zusammengestellt. Die Häufigkeitsverteilung der Potentiale unter diesen 210 Meßwerten zeigt die Abb. 12.
Diese Meßwerte wurden mit dem Chi^2-Test auf Normalverteilung überprüft. Dabei ergab sich eine Irrtumswahrscheinlichkeit von $p > 0.05$ für die Ablehnung der Nullhypothese, d. h. es konnte die Normalverteilung der Meßwerte nicht mit Signifikanz gesichert werden. Anschließend wurden die Daten darauf überprüft, ob die dargestellte Verteilung einer Summe aus zwei oder sogar drei Normalverteilungen entsprechen könnte. Die Chi^2-Tests ergaben allerdings wiederum keine Signifikanz auf dem genannten Niveau.
Die Beobachtung von AICKIN und THOMAS (1977) konnte also anhand unseres Datenmaterials weder eindeutig belegt noch eindeutig zurückgewiesen werden. Um das erforderliche Signifikanzniveau für eine solche Entscheidung angesichts der relativ geringen postulierten Potentialdifferenzen zu erreichen, wäre ein größerer Stichprobenumfang erforderlich. Es soll gleichzeitig darauf hingewiesen werden, daß die Beobachtungen der Autoren an Einzelzellen gewonnen wurden, die, wie oben dargestellt, durchaus anderen Selektionsbedingungen unterliegen können als Potential-Serienmessungen. Auch sind aus der

Abbildung 12 : Häufigkeitsverteilung der Höhe der Membranpotentiale von 210 Zwerchfellfasern aus 10 Präparaten in der Lösung A (35 °C). Die Abszisse zeigt die gemessenen Membranpotentiale E_M. Die Klassenbreite beträgt 1 mV, die Klassenmitten liegen jeweils in der Mitte zwischen zwei ganzen Zahlen. Die Ordinate gibt die absoluten Häufigkeiten an.



Literatur keine ähnlichen Beobachtungen bekannt ; insbesondere findet sich auch bei DULHUNTY (1978), die wie wir Serienmessungen durchführte, kein derartiger Hinweis.

5.2. Vergleich der Ergebnisse mit der Literatur

5.2.1. Reaktion des Membranpotentials auf die Reduktion des extrazellulären Chlorids

Dieses Problem wurde bereits von zahlreichen Autoren an vielen Geweben untersucht. Die Tab. 4 beschränkt sich auf Literaturangaben über die Verhältnisse am Schneckenneuron sowie an der Frosch- und Säugermuskulatur.
Zusammenfassend läßt sich über den jetzigen Stand der Erkenntnisse feststellen :

1. Beim Schneckenneuron, einer wegen ihrer Größe gut penetrierbaren und deshalb gut erforschten Avertebratenzelle, ist ein eindeutiger Einfluß des Chlorids auf das Membranpotential nicht gesichert.
2. Am Skeletmuskel des Frosches wurde inzwischen mehrfach die Erkenntnis von HODGKIN und HOROWICZ (1959) bestätigt, daß es zu keiner dauerhaften Potentialänderung nach Chloridreduktion kommt.
3. Bei der Herzmuskulatur des Säugers beschrieb die Mehrzahl der Autoren keine dauerhaften Potentialveränderungen ; allein VAUGHAN-JONES (1979 a, b) berichtete über eine starke Hyperpolarisation.
4. Bei der Skeletmuskulatur des Säugers ist die Situation unübersichtlich. Betrachtet man ausschließlich das Rattenzwerchfell, so fanden zwei Autoren (LÜLLMANN, 1961 ; VYSKOCIL, 1977) eine dauerhafte Hyperpolarisation, während vier Autoren (nimmt man die Arbeiten MOOLJs zusammen) keine signifikanten

Tabelle 4 : Einfluß der Reduktion der extrazellulären Chloridkonzentration auf das Membranpotential nach Literaturangaben (D. = Depolarisation ; H. = Hyperpolarisation)

Untersuchtes Gewebe	Substituierendes Ion	Puffersystem	Cl^--Reduktion	Reaktion des Membranpotentials	Autor
1. Nonvertebraten					
Schneckenneuron	Acetat	Bikarbonat	118 mM-25 mM	Kurzfristige stärkere D., dann konstante D. (4,5 mV)	KERKUT & MEECH (1967)
Schneckenneuron	Sulfat	Bikarbonat Phosphat	108 mM-0 mM	Leichte H., aber wahrscheinlich Artefakt	THOMAS (1977)
Schneckenneuron	Propionat Sulfat	Tris	203 mM-0 mM	Kurzfristige H., dann D.	ZIDEK et al. (1978)
2. Vertebraten					
2.1. Frosch					
M. semitendinosus	Sulfat	Phosphat	120 mM-30 mM	Kurzfristige D., dann Repolarisation zum Ausgangswert	HODGKIN & HOROWICZ (1959)
M. sartorius	Sulfat	Phosphat	120 mM-0 mM	Keine dauerhafte Potentialänderung	ADRIAN & FREYGANG (1962)

Tabelle 4 (Fortsetzung)

Untersuchtes Gewebe	Substituierendes Ion	Puffersystem	Cl^--Reduktion	Reaktion des Membranpotentials	Autor
M. sartorius	Glucuronat	HEPES	99 mM-35 mM	Keine oder nur geringe dauerhafte Potentialänderung	BOLTON & VAUGHAN-JONES (1977)
M. sartorius	Methylsulfat	Tris	131 mM-13 mM	Kurzfristige D., dann Repolarisation zum Ausgangswert	DÖRRSCHEIDT-KÄFER (1980)
2.2. Mammalia					
2.2.1. Herzmuskulatur					
Papillarmuskel	Methylsulfat	Phosphat Bikarbonat	145 mM-73 mM	Nur geringfügige Potentialänderung	HUTTER & NOBLE (1961)
Kammermuskulatur (Kaninchen)	Propionat	Phosphat Bikarbonat	148 mM-73 mM	Dauerhafte D. um 5 mV	FOZZARD & LEE (1976)
Purkinje-Faser (Schaf)	Acetylglycicinat, Methylsulfat, Methansulfonat	Phosphat Bikarbonat	148 mM-11 mM	Kurzfristige D. um 3-6 mV, keine dauerhafte Potentialänderung	KENYON & GIBBONS (1977)

Tabelle 4 (Fortsetzung)

Untersuchtes Gewebe	Substituierendes Ion	Puffersystem	Cl^--Reduktion	Reaktion des Membranpotentials	Autor
Purkinje-Faser (Schaf)	1. Glucuronat 2. Benzensulfonat 3. Methylsulfat 4. Nitrat	HEPES	130 mM- 7 mM	1. Dauerhafte H. (10-15 mV) 2. H. wie unter 1. 3. keine Änderung 4. nur flüchtige H.	VAUGHAN-JONES (1979 a)
2.2.3. Skeletmuskulatur					
Zwerchfell (Ratte)	Methylsulfat	Phosphat Bikarbonat	145 mM- 3 mM	Dauerhafte H. um 10 mV	LÜLLMANN (1961)
M. intercostalis (Ziege)	Methylsulfat	Phosphat Bikarbonat	159 mM- 5 mM	Normale Tiere: D. um 8 mV Myotone Tiere: H. um 2.5 mV	BRYANT & MOLES-AGUILERA (1971)
Zwerchfell (Ratte)	Isethionat	Phosphat Bikarbonat	146 mM- 44 mM	Kurzfristige D. um bis zu 40 mV, keine dauerhafte Änderung	RÜDEL & SENGES (1972)
Zwerchfell (Ratte)	Isethionat	Phosphat Bikarbonat	110 mM- 0 mM	Leichte dauerhafte H. um 3 mV	DEN HERTOG & MOOIJ (1976)

Tabelle 4 (Fortsetzung)

Untersuchtes Gewebe	Substituierendes Ion	Puffersystem	Cl^--Reduktion	Reaktion des Membranpotentials	Autor
Denerviertes Rattenzwerchfell	Isethionat	Phosphat Bikarbonat	110 mM-10 mM	Keine signifikante dauerhafte Potentialänderung	MOOIJ (1976)
Zwerchfell (Ratte)	Isethionat	Phosphat Bikarbonat	110 mM-40 mM	Leichte dauerhafte D. um 5 %	MOOIJ et al. (1976)
Zwerchfell	Methylsulfat Nitrat	Tris	146 mM-0 mM	Keine dauerhafte Potentialänderung	PALADE & BARCHI (1977)
Zwerchfell (Ratte)	Sulfat	Phosphat Bikarbonat	148 mM-0 mM	Dauerhafte H. um mehr als 10 mV	VYSKOCIL (1977)
Zwerchfell, M. sternomastoideus (Ratte); Mm. EDL und soleus (Maus)	Sulfat	HEPES	160 mM-3 mM	Kurzfristige D., dann dauerhafte H. um mehr als 20 mV bei allen Muskeln außer am Zwerchfell; dort keine Änderung	DULHUNTY (1978)

dauerhaften Potentialveränderungen angaben. Allerdings läßt die Tab. 4 auch weitgehende Unterschiede der Versuchsbedingungen erkennen, was die Substituentien und die Puffersysteme betrifft. Daß auch weitgehend übereinstimmende Experimentierbedingungen kein Garant für übereinstimmende Ergebnisse waren, zeigen die Divergenzen zwischen VYSKOCIL und DULHUNTY. Unsere eigenen Befunde entsprechen denen VYSOCILs und LÜLLMANNs.

5.2.2. Versuch einer Erklärung der Divergenzen zwischen Literaturangaben und eigenen Ergebnissen

Zunächst fällt auf, daß alle Autoren, die mit Isethionat als substituierendem Anion gearbeitet haben, über keine wesentlichen Änderungen des Ruhemembranpotentials berichten. Dies kann als Hinweis darauf gewertet werden, daß Isethionat gar nicht so inert ist, wie angenommen, sondern an der Muskelmembran eine spezifische Eigenwirkung entfaltet. Diese Überlegung wird gestützt durch die Beobachtung von WIDDICOMBE und WELSH (1980), die an der Hundetrachea einen irreversiblen toxischen Effekt durch Isethionat auslösen konnten. Dieser Effekt fand sich freilich auch bei Verwendung anderer organischer Chlorid-Substituentien, darunter Methylsulfat, und AL-BAZZAZ und AL-AWQATI (1979) beschrieben ähnliche Phänomene beim Einsatz von Gluconat und Sulfat als Chlorid-Ersatzstoffe ; und eine Gleichwertigkeit von Isethionat und Sulfat als Chlorid-Substituentien war schon 1968 von RANG und RITCHIE für die Nervenfaser des Kaninchens angegeben worden. Als Hinweis auf Wirkungsdifferenzen zwischen Isethionat und Methylsulfat/Sulfat mag wiederum die Tatsache dienen, daß RÜDEL und SENGES (1972) mit Isethionat einen deutlich geringeren Anteil der Chloridleitfähigkeit an der Gesamtleitfähigkeit maßen (72 %) als PALADE und BARCHI (88 %).

Die Literaturangaben sind also höchst verwirrend, aber einige Indizien sprechen doch für die Vermutung von VAUGHAN-JONES (1979 a), die beim Chlorid-Entzug beobachteten Phänomene seien in Wirklichkeit spezifische Wirkungen der Substituentien. Leider ist über diese Eigenwirkungen noch zu wenig bekannt, um ein abschließendes Urteil fällen zu können.
Die unterschiedlichen Ergebnisse von LÜLLMANN (1961) und PALADE und BARCHI (1977) zu erklären, ist schwierig, denn beidesmal wurde Chlorid durch Methylsulfat ersetzt. Hier könnten nun die unterschiedlichen Puffersysteme eine Rolle spielen : LÜLLMANN arbeitete mit Bikarbonat und Phosphat, PALADE und BARCHI hingegen mit Tris. Daß LÜLLMANN eine Hyperpolarisation sah, könnte darauf zurückzuführen sein, daß er der Bikarbonat-Chlorid-Pumpe nach dem Konzept von AICKIN und THOMAS (1977) (siehe 5.3.2.) Substrat anbot, während PALADE und BARCHI diesen Mechanismus blockierten.

Die Versuchsergebnisse mit Methylsulfat bzw. Sulfat sollten vergleichbar sein, denn PALADE und BARCHI fanden für beide Chlorid-Substituentien eine praktisch identische Reduktion des Membranwiderstandes. Dennoch seien die Arbeiten über den Chloridersatz mit Sulfat getrennt betrachtet. VYSKOCIL (1977) beschrieb eine dauerhafte Hyperpolarisation un mehr als 10 mV ; DULHUNTY (1978) bestritt diese für das Zwerchfell.
Die einzige Möglichkeit einer Erklärung liegt auch hier in dem einzigen wesentlichen Unterschied in den Versuchsbedingungen : DULHUNTY pufferte ihre Lösungen mit HEPES, VYSKOCIL hingegen arbeitete mit Phosphat und Bikarbonat.
Gegen diese Hypothese sprechen aber unsere eigenen Ergebnisse, die in einer HEPES-gepufferten Lösung unter weitgehend denselben Bedingungen gewonnen wurden, wie sie DULHUNTY beschreibt. An einer Hyperpolarisation der Fasern kann nach den ausführlich vorgetragenen Befunden nicht gezweifelt werden ; deshalb ist die Behauptung DULHUNTYs (1978) abzulehnen, das Membranpotential der Zwerch-

fellfasern bleibe im Gegensatz zu der übrigen Skeletmuskulatur bei einer Chloridreduktion konstant. Wie DULHUNTY schreibt, hat sie nur ein einziges Zwerchfellpräparat untersucht ; vielleicht hat dieses aus uns unerklärlichen Gründen anders reagiert.

5.2.3. Reaktion der intrazellulären Kaliumaktivität auf die Chloridreduktion

Aus der Literatur sind uns keine Berichte über Messungen der intrazellulären Kaliumaktivität nach einer Chloridverminderung im Außenmedium bekannt. Hingegen wurde die intrazelluläre Kaliumaktivität der Zwerchfellfasern unter physiologischen Bedingungen bereits von KERNAN und MACDERMOTT (1976) mit der auch in dieser angewandten Methode untersucht.
Die dort angegebenen Werte für a^i_K differieren von unseren nicht signifikant, jedoch weichen die daraus berechneten Werte für E_K beträchtlich voneinander ab (89.0 mV gegenüber den von uns ermittelten 104.6 mV in Lösung A). Diese Diskrepanz erklärt sich aus folgenden Umständen :

1. Die geringere Kalium-Konzentration unserer Außenlösung (3.5 mM gegenüber 5 mM in der zitierten Arbeit) ergab einen größeren Aktivitätsquotient a^i_K / a^o_K und damit ein größeres E_K.
2. Im Gegensatz zu KERNAN und MACDERMOTT (1976) arbeiteten wir nicht bei 20 ^oC, sondern bei 35 ^oC. Damit war die Temperaturkonstante höher und so auch das E_K.
3. Wir verwendeten zur Berechnung der Kaliumaktivität in der Außenlösung einen deutlich niedrigeren Aktivitätsquotienten (0.73) als die genannten Autoren (0.88), wahrscheinlich weil ihre Lösung eine geringere Ionenstärke hatte.

Bemerkenswert erscheint auch, daß das von KERNAN und MACDERMOTT (1976) angegebene mittlere Membranpotential um mehr als 9 mV über dem von uns gemessenen liegt. Hier wäre zu diskutieren,

ob unsere HEPES-gepufferte Lösung, wie von AICKIN und THOMAS (1977) postuliert, nicht doch depolarisierend wirkt, denn KERNAN und MACDERMOTT (1976) arbeiteten mit einer modifizierten KREBS-Lösung mit Bikarbonat/Carbogen.
Daß die letztgenannten Autoren jedoch eine signifikante Differenz (6.6 mV) zwischen E_K und E_M angeben, deckt sich völlig mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit. Es soll noch erwähnt werden, daß zahlreiche Autoren (so z.B. SRETER und WOO, 1963 ; WESTPHAL, 1968) über die indirekte Bestimmung des intrazellulären Kaliums der Zwerchfellfasern mit Hilfe der Flammenphotometrie berichteten. Diese Ergebnisse eignen sich aber nur mit großen Vorbehalten zum Vergleich mit direkten Aktivitätsbestimmungen mittels ionenselektiver Elektroden, da beim Schluß von flammenphotometrischen Meßergebnissen auf intrazelluläre Aktivitäten zu viele Fehlerquellen existieren, insbesondere die Größe des Extrazellulärraumes und die Höhe der Aktivitätsquotienten.

5.3. Ionentransportmechanismen an der Zellmembran

5.3.1. Argumente für die Existenz einer Chloridpumpe am Rattenzwerchfell

Die Argumente für die Existenz eines einwärtsgerichteten, energieverbrauchenden Chloridtransports am Diaphragma seien noch einmal zusammengefaßt:

1. Die Hyperpolarisation der Fasern nach Chloridentzug im Außenmedium spricht für die Blockierung einer depolarisierenden Chloridpumpe, da sie durch eine Leitfähigkeitsänderung allein in dem beobachteten Ausmaß nicht zu erklären ist und die Zelle nicht vermehrt Kalium pumpt.
2. Das Membranpotential liegt erheblich unter dem Kaliumpotential. Diese Beobachtung könnte durch eine Chloridpumpe mit

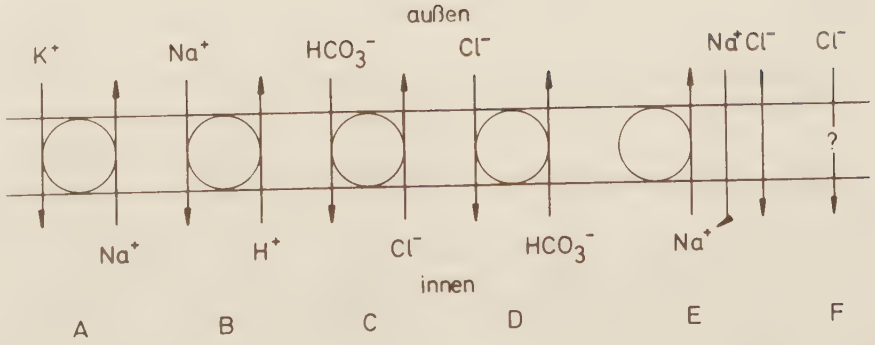
depolarisierendem Effekt erklärt werden.

3. Die kurzfristige Hyperpolarisation beim Wechsel von 80 mM Cl^- zu 160 mM Cl^- ist bereits bei 25 °C kürzer und weniger ausgeprägt als die kurzfristige Depolarisation beim Wechsel in umgekehrter Richtung ; bei 35 °C bleibt die erstgenannte Reaktion ganz aus. Die Erklärung dieser Befunde fällt dann leicht, wenn man annimmt, daß bei der Chloridreduktion die Pumpe inhibiert wird und die Depolarisation durch eine rein passive, langsamere Chloriddiffusion aus der Faser aufgehoben wird, während bei der Rückkehr in die physiologische Lösung zu der passiven Diffusion des Chlorids in die Faser eine aktive Pumpwirkung kommt.
4. Für einen energieverbrauchenden Prozeß an der Membran spricht endlich der Q_{10}-Wert von 1.7 für Hyperpolarisation und Depolarisation.

5.3.2. Überlegungen zur Natur der Chloridpumpe

Ein aktiver Chloridtransport ist an einer Vielzahl von Geweben nachgewiesen. Einen Überblick über nachgewiesene und hypothetische Transportmechanismen am Säugermuskel gibt die Abb. 13.
Am Riesenaxon des Tintenfisches existiert ein ATP-verbrauchender Einwärtstransport für Chlorid im Austausch gegen Bikarbonat (KEYNES, 1963 ; SCRUGGS und LANDOWNE, 1975 ; RUSSELL, 1976). Ebenfalls ein aktiver Chloridtransport scheint an Aplysia-Neuronen vorzuliegen (BROWN et al., 1970 ; RUSSELL und BROWN, 1971, 1972). Gleiches gilt für die Muskelfaser des Riesenbarnacle (DIPOLO, 1972 ; RUSSELL und BRODWICK, 1979). Am Motoneuron des Frosches konnte eine einwärtsgerichtete Chloridpumpe nachgewiesen werden (BÜHRLE und SONNHOF, 1979 ; SONNHOF und BÜHRLE, 1980).
Für den Warmblüter liegen Berichte über einen aktiven Chlorid-Auswärtstransport an Neuronen vor, der für die Inhibitorischen

Abbildung 13 : Nachgewiesene und hypothetische Transportvorgänge an der Membran der Säugermuskulatur (Legende siehe S. 65)



Legende zur Abb. 13 :

Schema A zeigt die Natrium-Kalium-Pumpe, die als mögliche indirekte Energiequelle für die folgenden Austauschmechanismen in Frage kommt. B (Natrium-Wasserstoffionen-Austausch) und C (Bikarbonat-Chlorid-Austausch) sind an der Skeletmuskelfaser der Maus nachgewiesen, wo sie an der Regulation des inneren pH beteiligt sind (AICKIN und THOMAS, 1977). Schema D (Chlorid-Bikarbonat-Austausch) ist an der Purkinje-Faser des Schafherzens nachgewiesen und dort für den intrazellulären Chloridüberschuß mitverantwortlich (VAUGHAN-JONES, 1979 b). Bei C und D könnte es sich um denselben, je nach ionaler Komposition der Innen- und Außenlösung in anderer Richtung arbeitenden Transportmechanismus handeln. E zeigt links die am Rattenzwerchfell nachgewiesene elektrogene Natriumpumpe (DEN HERTOG und MOOIJ, 1976), rechts einen hypothetischen gekoppelten Na-Cl-Aufnahme-Mechanismus. F soll schließlich die Möglichkeit eines weiteren, noch nicht näher charakterisierten Transportwegs des Chlorids ins Zellinnere andeuten.

Postsynaptischen Potentials (IPSP) verantwortlich sein soll (LUX, 1971 ; LLINAS und BAKER, 1972 ; LLINAS u.a., 1974 ; MEYER und LUX, 1974). Zahlreiche Berichte existieren über den aktiven Chloridtransport in Epithelien.
Am Skeletmuskel der Maus spielt ein aktiver, nach außen gerichteter Chloridtransport bei der Regulation des intrazellulären pH eine Rolle (AICKIN und THOMAS, 1977). Nach diesem Konzept wird der intrazelluläre pH durch zwei Mechanismen stärker im Alkalischen gehalten, als es bei passiver H^+-Verteilung zu erwarten wäre : Einerseits scheidet die Zelle im Austausch gegen Natrium-Ionen Protonen aus, zum anderen findet eine Cl^--Extrusion über eine Cl^-/HCO_3^--Pumpe statt. Der letztgenannte Mechanismus würde also eher einen intrazellulären Chlorid-Mangel als eine Anreicherung dieses Ions nahelegen.

Ein anderes Licht auf die Wirkung dieser Pumpe wirft jedoch die Arbeit von VAUGHAN-JONES (1979 b), der mit Cl^--selektiven Mikroelektroden an der Purkinje-Faser des Schafherzens eine höhere intrazelluläre Chloridaktivität maß, als dem DONNAN-Gleichgewicht entsprochen hätte. Dies bestätigten auch die Messungen von WALKER (1980) an demselben Präparat. VAUGHAN-JONES postulierte eine einwärtsgerichtete Cl^-/HCO_3^--Pumpe, also einen Einwärtstransport von Chlorid im Austausch gegen intrazelluläres Bikarbonat. Diese Pumpe erwies sich bei ihm ebenso wie die Auswärtspumpe von AICKIN und THOMAS (1977) als durch SITS (4-Acetamid-4-Isothiocyanostilben-2.2-Disulfonsäure) hemmbar.
Die zitierten Berichte über Cl^-/HCO_3^--Pumpen lassen sich miteinander vereinbaren, wenn man folgende Hypothese akzeptiert:
AICKIN und THOMAS (1977) wiesen die auswärtsgerichtete Pumpe nach, indem sie die Muskelfaser mit Säure beluden ("acid load"), um dann in physiologischer Außenlösung den Wiederanstieg des intrazellulären pH zu registrieren. Blockierten sie die Na^+/H^+-Pumpe mit Amilorid, so wurde der Wiederanstieg zwar verlangsamt, aber nicht beseitigt. Das passierte erst, wenn sie auch noch die Cl^-/HCO_3^--Pumpe mit SITS hemmten. Daraus folgerten die Autoren, daß diese Pumpe Chlorid aus der Zelle pumpe.
Es wäre jedoch denkbar, daß auch am Skeletmuskel der Maus diese Pumpe nur unter den von AICKIN und THOMAS (1977) vorgegebenen erheblichen Abweichungen von der Homöostase Cl^--Ionen nach außen pumpt, unter Normalbedingungen jedoch die pH-Regulation allein durch den Na^+/H^+-Austausch gesichert wird und die Cl^-/HCO_3^--Pumpe dann in umgekehrter Richtung arbeitet, also Chlorid in die Zelle pumpt, wie von VAUGHAN-JONES (1979 b) beschrieben.

Allerdings reicht der beschriebene Transportmechanismus wahrscheinlich noch nicht aus, um die intrazelluläre Chloridanreicherung vollends zu erklären. Darauf wies VAUGHAN-JONES (1979 b) hin, denn er fand auch bei Blockierung der Cl^-/HCO_3^--Pumpe noch eine erhöhte intrazelluläre Chloridaktivität.

5.3.3. Einfluß einer elektrogenen Natriumpumpe und eines gekoppelten Natrium-Chlorid-Transports auf das Membranpotential

Seit der Beobachtung von KERNAN (1960) am M. sartorius des Froschs wird über den Einfluß einer elektrogenen Natriumpumpe auf das Membranpotential an verschiedenen Geweben diskutiert. Zusammenstellungen der Literatur zu dieser Frage finden sich bei THOMAS (1972) und KERNAN (1980). So wurde eine elektrogene Natriumpumpe von RANG und RITCHIE (1968) an der Nervenfaser und von AKAIKE (1975) an der Skeletmuskelfaser des Säugers beschrieben. DEN HERTOG und MOOIJ (1976) gelang es, diese elektrogene Natriumpumpe auch an dem hier untersuchten Muskel, dem Zwerchfell der Ratte, nachzuweisen.
Inwiefern ist die elektrogene Natriumpumpe nun bei der Interpretation der von uns beobachteten Membranreaktionen zu berücksichtigen?
Da in der Chlorid-reduzierten Lösung AB gleichzeitig auch die Natrium-Konzentration reduziert war, wäre zunächst mit einer Hyperpolarisation zu rechnen, weil die Pumpe gegen einen geringeren Natrium-Gradienten arbeiten muß, auf Dauer aber mit einer Depolarisation, da schließlich in der Faser weniger Natrium als Substrat für die Pumpe zur Verfügung steht (THOMAS, 1972). Tatsächlich wurde aber eine Hyperpolarisation registriert, und es muß offen bleiben, ob sich darin die vermutete Depolarisation "versteckt".
Unabhängig davon ist an einen gekoppelten Natrium-Chlorid-Transport zu denken, der als effektive Chloridpumpe wirken könnte. Solche Transportmechanismen sind an Epithelien nichts Ungewöhnliches (Zusammenfassung der Literatur bei FRIZZELL et al., 1979). Von RUSSELL (1979) wurde ein gekoppelter Na-Cl-Transport für das Tintenfisch-Axon beschrieben, und nach WIDDICOMBE und BRADING (1980) ist er für die glatte Säugermuskulatur anzunehmen. Die Abhängigkeit eines einwärts gerichteten Chloridtrans-

ports vom Na^+-Gradienten wurde jüngst auch von WALKER (1980) für die Purkinje-Faser des Schafherzens postuliert. Die bereits untersuchten Na-Cl-Aufnahmemechanismen beziehen ihre Energie vom Na^+-Gradienten an der Membran, der wiederum durch die Natrium-Kalium-Pumpe und die elektrogene Natrium-Pumpe aufrechterhalten wird. Die Wirkung des noch völlig hypothetischen gekoppelten Na-Cl-Transports entspräche durch den Chlorid-akkumulierenden Effekt wahrscheinlich der oben diskutierten Chlorid-Bikarbonat-Pumpe - es wäre ein depolarisierender Einfluß auf das Ruhemembranpotential zu erwarten.

5.4. Aufgaben für die weitere Forschung

Wie die Diskussion gezeigt hat, besteht noch weitgehende Unklarheit, auf welche Membranvorgänge sich die in dieser Arbeit dargestellten Befunde zurückführen lassen. Zur weiteren Abklärung sollte zunächst der Einfluß des CO_2/HCO_3^--Puffersystems auf die Membranreaktionen studiert werden.
Neben einer Überprüfung der Wirkung von SITS wäre dann dem Effekt von Piretanide auf den Warmblütermuskel nachzugehen. Laut ZEUTHEN et al. (1978) soll diese Substanz den aktiven Chloridtransport an der Muschelzelle inhibieren. Es wäre denkbar, daß es sich dabei um einen SITS-unabhängigen Transportmechanismus handelt.

Schließlich bedarf das zuletzt behandelte Problem der elektrogenen Natriumpumpe und des gekoppelten Na-Cl-Transports einer weiteren Klärung.
Eines scheint auf alle Fälle sicher : Die Unbefangenheit, mit der noch vor nicht allzu langer Zeit behauptet wurde, die Chlorid-Ionen seien an der Membran der Säugermuskulatur passiv verteilt, ist vorerst dahin, auch wenn die genauere Erforschung der Transportmechanismen noch aussteht.

6. ZUSAMMENFASSUNG

Mit Hilfe konventioneller und Kalium-selektiver Mikroelektroden wurde am isolierten Zwerchfell der Ratte untersucht, wie das Membranpotential und die intrazelluläre Kaliumaktivität von der extrazellulären Chloridaktivität beeinflußt werden und welche Rolle dabei der Temperatur zukommt. Es konnten die folgenden Befunde erhoben werden:

1. Bei der Reduktion der extrazellulären Chloridaktivität auf die Hälfte ihres Ausgangswerts kommt es zunächst zu einer passageren Depolarisation, dann zu einer konstanten Hyperpolarisation der Fasern.
2. Bei Rückkehr in eine Lösung mit normaler Chloridaktivität hyperpolarisieren die Fasern vorübergehend (nur bei 25 ^{o}C), um anschließend dauerhaft zu depolarisieren.
3. Die Temperatur hat keinen signifikanten Einfluß auf die Höhe des Membranpotentials in normaler und in Chlorid-reduzierter Lösung. Einen signifikanten Einfluß hat die Temperatur jedoch auf die Geschwindigkeit der Hyperpolarisation und der Depolarisation. Der Q_{10}-Wert liegt bei 1.7. Außerdem findet sich bei 35 ^{o}C bei der Rückkehr in die normale Lösung keine passagere Hyperpolarisation mehr.
4. Die Chloridaktivität der Außenlösung hat keinen signifikanten Einfluß auf die intrazelluläre Kaliumaktivität. Das berechnete Kaliumpotential liegt erheblich über dem Membranpotential.
5. Es wird gefolgert, daß sich in Skeletmuskelfasern von Säugern Cl^- nicht im elektrochemischen Gleichgewicht befindet, sondern in einer höheren intrazellulären Aktivität vorliegt, als es einem DONNAN-Gleichgewicht entspräche.
6. Es wird diskutiert, welche Mechanismen für einen aktiven Chloridtransport in Frage kommen könnten.

LITERATURVERZEICHNIS

AL-BAZZAZ, F.J., AL-AWQATI, Q: Interaction between sodium and chloride in canine tracheal mucosa. J. Appl. Physiol.: Respirat. Environ. Exercise Physiol. 46, 111-119 (1979)

ADRIAN, R.H.: Internal chloride concentration and chloride efflux of frog muscle. J. Physiol. 156, 623-632 (1961)

ADRIAN, R.H., FREYGANG, W.H.: The K and Cl conductance of frog muscle membrane. J. Physiol. 163, 61-103 (1962)

AICKIN, C.C., THOMAS, R.C.: An investigation of the ionic mechanism of intracellular pH regulation in mouse soleus fibres. J. Physiol. 273, 295-316 (1977)

AKAIKE, N.: Contribution of an electrogenic sodium pump to membrane potential in mammalian skeletal muscle fibres. J. Physiol. 245, 499-520 (1975)

ARMSTRONG, W.M., WOJTKOWSKI, W., BIXEN, W.R.: A new solid state microelectrode for measuring intracellular chloride activities. Biochim. Biophys. Acta 465, 165-170 (1977)

BAUMGARTEN, C.M., FOZZARD, H.A.: Intracellular Cl activity of skeletal and heart muscle. Biophys. J. 21, 184 a (1978)

BOLTON, T.B., VAUGHAN-JONES, R.D.: Continous direct measurement of intracellular chloride and pH in frog skeletal muscle. J. Physiol. 270, 801-833 (1977)

BOYLE, P.J., CONWAY, E.J.: Potassium accumulation in muscle and associated changes. J. Physiol. 100, 1-63 (1941)

BROWN, A.M., WALKER, J.L., SUTTON, R.B.: Increased chloride conductance as the proximate cause of hydrogen ion concentration effects in Aplysia neurons. J. Gen. Physiol. 56, 559-582 (1970)

BRYANT, S.H., MORALES-AGUILERA, A.: Chloride conductance in normal and myotonic muscle fibres and the action of monocarboxylic aromatic acids. J. Physiol. 219, 367-383 (1971)

BÜHRLE, C.P., SONNHOF, U.: The ionic mechanism of the IPSP in frog spinal motoneurones. Pflügers Arch. 382, R 35 (1979)

CAMPION, D.S.: Resting membrane potential and ionic distribution in fast- und slow-twitch mammalian muscle. J. Clin. Invest. 54 (3), 514-518 (1974)

CREESE, R., SCHOLES, N.W., TAYLOR, D.B.: Temperature and resting potential of diaphragm muscle in a CO_2-bicarbonate medium. J. Pharmacol. Exp. Ther. 124, 47-52 (1968)

DEN HERTOG, A., MOOIJ, J.J.A.: Potassium induced potential changes in rat diaphragm muscle. Pflügers Arch. 362, 69-79 (1976)

DIPOLO, R.: Chloride fluxes in isolated dialyzed barnacle muscle fibers. J. Gen. Physiol. 60, 471-497 (1972)

DÖRRSCHEIDT-KÄFER, M.: Persönliche Mitteilung (1980)

DULHUNTY, A.F.: K-contractures and membrane potential in mammalian skeletal muscle. Nature 266, 75-78 (1977)

DULHUNTY, A.F.: The dependence of membrane potential on extracellular chloride concentration in mammalian skeletal muscle fibres. J. Physiol. 276, 67-82 (1978)

FOZZARD, H.A., LEE, C.O.: Influence of changes in external potassium and chloride ions on membrane potential and intracellular potassium ion activity in rabbit ventricular muscle. J. Physiol. 256, 663-689 (1976)

FRIZELL, R.A., FIELD, M., SHULTZ, S.G.: Sodium-coupled chloride transport in epithelial tissues. Am. J. Physiol. 236, F 1-8 (1979)

HODGKIN, A.L., HOROWICZ, P.: The influence of potassium and chloride ions on the membrane potential of single muscle fibres. J. Physiol. 148, 127-160 (1959)

HODGKIN, A.L., HOROWICZ, P.: The effect of sudden changes in ionic concentrations on the membrane potential of single muscle fibres. J. Physiol. 153, 370-385 (1960)

HUTTER, O.F., NOBLE, D.: Anion conductance of cardiac muscle. J. Physiol. 157, 335-350 (1961)

KENYON, J.L., GIBBONS, W.R.: Effects of low-chloride solutions on action potentials of sheep cardiac Purkinje fibres. J. Gen. Physiol. 70, 635-660 (1977)

KERKUT, G.A., MEECH, R.W.: The effect of ions on the membrane potential of snail neurones. Comp. Biochem. Physiol. 20, 411-429 (1967)

KERNAN, R.P.: Resting potential in isolated frog sartorius fibres at low external potassium concentrations. Nature 185, 471 (1960)

KERNAN, R.P.: Sources of electrical potential across membranes. Ir. J. Med. Sci. 149, 137-147 (1980)

KERNAN, R.P., MACDERMOTT, M.: Intracellular potassium concentrations and extracellular spaces in rat skeletal muscles immersed in normal, hypotonic and high-K modified Krebs fluid, determined by potassium-selective microelectrodes. J. Physiol. 263, 158 P (1976)

KERNAN, R.P., MACDERMOTT, M., WESTPHAL, W.: Measurement of chloride activity within frog sartorius muscle fibres by means of chlorid-sensitive microelectrodes. J. Physiol. 241, 60 - 61 P (1974)

KEYNES, R. D.: Chloride in the squid giant axon. J. Physiol. 169, 690-705 (1963)

LLINAS, R., BAKER, R.: A chloride-dependent inhibitory postsynaptic potential in cat trochlear motoneurons. J. Neurophysiol. 35, 484-492 (1972)

LLINAS, R., BAKER, R., PRECHT, W.: Blockage of inhibition by ammonium acetate action on chloride pump in cat trochlear motoneurons. J. Neurophysiol. 37, 522-532 (1974)

LORKOVIC, H., TOMANEK, R.J.: Potassium and chloride conductances in normal and denervated rat muscles. Am. J. Physiol. 232, C 109-114 (1977)

LÜLLMANN, H.: Das Verhalten normaler und denervierter Skeletmuskulatur in chloridfreiem Medium (Methylsulfat-Tyrodelösung). Naunyn-Schmiedeb. Arch. Pharmacol. 240, 351-360 (1961)

LUX, H. D.: Ammonium and chloride extrusion : hyperpolarizing synaptic inhibition in spinal motoneurons. Science 173, 555-557 (1971)

MACCHIA, D. D., BAUMGARTEN, D. M.: Is chloride passively distributed in skeletal muscle in vivo? Pflügers Arch. 382, 193-195 (1979)

MACCHIA, D. D., POLIMENI, P. I., PAGE, E.: Cellular Cl content and concentration of amphibian skeletal and heart muscle. Am. J. Physiol. 235, C 122-127 (1978)

MACDERMOTT, M., KERNAN, R. P.: Intracellular chloride activities in frog semitendinosus muscle bathed in potassium-deficient ringer. Ir. J. Med. Sci. 144, 407 (1975)

MEYER, H., LUX, H. D.: Action of ammonium on a chloride pump. Pflügers Arch. 350, 185-195 (1974)

MOOIJ, J.J.A.: Influence of chloride and sodium pump activity on carbachol- and acetylcholine-induced depolarisations in denervated rat diaphragm. Europ. J. Pharmacol. 38, 157-163 (1976)

MOOIJ, J.J.A., EVERS, C.D.J., RAS, R.: The masking role of the sodium pump and chloride ions on the effect of carbachol in- and outside the endplate region of rat diaphragm muscle. Europ. J. Pharmacol. 37, 275-282 (1976)

NETTER, H.: Theoretische Biochemie. Physikalisch-chemische Grundlagen der Lebensvorgänge. Berlin, Göttingen, Heidelberg (1959)

NIKOLSKI, B.P.: The story of the glass electrode. Zh. Fiziol. Khim. 10, 495-503 (1937)

PALADE, P.T., BARCHI, R.I.: Characteristics of chloride conductance in muscle fibres of the rat diaphragm. J. Gen. Physiol. 69, 325-342 (1977)

PARTRIDGE, L.D., THOMAS, R.C.: A twelve-way rotary tap for changing physiological solutions. J. Physiol. 245, 22-23 P (1975)

RANG, H.P., RITCHIE, J.M.: On the electrogenic sodium pump in mammalian non-myelinated nerve fibres and its activation by various external cations. J. Physiol. 196, 183-221 (1968)

RÜDEL, R., SENGES, J.: Mammalian skeletal muscle : reduced chloride conductance in drug-induced myotonia and induction of myotonia by low-chloride solution. Naunyn-Schmiedeb. Arch. Pharmacol. 274, 337-347 (1972)

RUSSELL, J.M.: ATP-dependent chloride influx into internally dialyzed squid giant axons. J. Membrane Biol. 28, 335-349 (1976)

RUSSELL, J.M.: Chloride and sodium influx : a coupled uptake mechanism in the squid giant axon. J. Gen. Physiol. 73, 801-818 (1979)

RUSSELL, J.M., BRODWICK, M.S.: Properties of chloride transport in barnacle muscle fibres. J. Gen. Physiol. 73, 343-368 (1979)

RUSSELL, J.M., BROWN, A.M.: Active transport of chloride by the giant neuron of the Aplysia abdominal ganglion. J. Gen. Physiol. 60, 499-518 (1972)

RUSSELL, J.M., BROWN, A.M.: Effects of cooling and ouabain on intracellular activities of K^+ and Cl^- in the Aplysia giant cell. Fed. Proc. 30, 255 (1971)

SACHS, L.: Angewandte Statistik. Berlin, Heidelberg, New York, 5. Aufl. (1978)

SCRUGGS, V., LANDOWNE, D.: The temperature dependence of chloride fluxes in the squid giant axon. Biophys. J. 15, 126 a (1975)

SONNHOF, U., BÜHRLE, C.P.: Depolarizing IPSPs in frog spinal motoneurons : a consequence of an inwardly directed Cl^- pump. In : Satellite Symposium : Ion-selective microelectrodes and their use in excitable tissues. Abstracts. July 9-11, 1980, Prague, Czechoslovakia, 31 (1980)

SPITZER, K.W., WALKER, J.L.: Changes in liquid-junction potential following chloride replacement in cat papillary muscle. Pflügers Arch. 382, 281-284 (1979)

SRETER, F.A., WOO, G.: Cell water, sodium and potassium in red and white mammalian muscles. Am. J. Physiol. 205, 1290-1294 (1963)

THOMAS, R.C.: Electrogenic sodium pump in nerve and muscle cells. Physiol. Rev. 52, 563-594 (1972)

THOMAS, R.C.: The role of bicarbonate, chloride and sodium ions in the regulation of intracellular pH in snail neurones. J. Physiol. 273, 317-338 (1977)

VAUGHAN-JONES, R. D.: Non-passive chloride distribution in mammalian heart muscle : micro-electrode measurement of the intracellular chloride activity. J. Physiol. 295, 83-109 (1979 a)

VAUGHAN-JONES, R. D.: Regulation of chloride in quiescent sheep-heart purkinje fibres studied using intracellular chloride and pH-sensitive micro-electrodes. J. Physiol. 295, 111-137 (1979 b)

VYSKOCIL, F.: Diazepam blockade of repetitive action potentials in skeletal muscle fibres. A model of its membrane action. Brain Res. 133, 315-328 (1977)

WALKER, J. L.: Intracellular K and Cl activities in sheep purkinje fibres. In : Satellite Symposium : Ion-selective microelectrodes and their use in excitable tissues. Abstracts. July 9-11, 1980, Prague, Czechoslovakia, 35 (1980)

WALKER, J. L.: Ion specific liquid ion exchanger microelectrodes. Analyt. Chem. 43, 89 A - 93 A (1971)

WALKER, J. L., BROWN, H. M.: Intracellular ionic activity measurement in nerve and muscle. Physiol. Rev. 57 (4), 729-778 (1977)

WAREHAM, A. C.: Effect of denervation and ouabain on the response of the resting membrane potential of rat skeletal muscle to potassium. Pflügers Arch. 373, 225-228 (1978)

WESTPHAL, W.: Erregung und aktiver Kationentransport-Versuche am isolierten Zwerchfell der Ratte. Habilitationsschrift, Würzburg (1966)

WIDDICOMBE, J. H., BRADING, A. F.: A possible role of linked Na und Cl movement in active Cl uptake in smooth muscle. Pflügers Arch. 380, 35-37 (1980)

WIDDICOMBE, J.H., WELSH, H.J.: Anion selectivity of the chloride-transport process in dog tracheal epithelium. Am. J. Physiol. 239, C 112-117 (1980)

ZEUTHEN, T., RAMOS, M., ELLORY, J.C.: Inhibition of active chloride transport by piretanide. Nature 273, 678-680 (1978)

ZIDECK, W., SPECKMANN, E.J., LEHMENKÜHLER, S.: Dependency of the resting membrane potential on the extracellular chloride concentration in identified neurons of Helix Potamia. Neurosci. Lett. 7, 163-166 (1978)

ZOLOVICK, A.J., NORMAN, R.I., FEDDE, M.R.: Membrane constants of muscle fibres of rat diaphragm. Am. J. Physiol. 219, 654-657 (1970)

Mein besonderer Dank gilt Herrn Professor Dr. med. Wolfgang Westphal, der diese Arbeit angeregt und in ständiger Gesprächsbereitschaft begleitet hat. Ihm verdanke ich auch die Vermittlung an das University College Dublin.

Herrn Professor Dr. med. Erich Bauereisen, Vorstand des Physiologischen Instituts der Universität Würzburg, sei ebenfalls herzlich gedankt, da er in entgegenkommender Weise die Untersuchungen an seinem Institut ermöglicht und mit Interesse verfolgt hat.

Mein ausdrücklicher Dank gilt auch Herrn Professor Roderick P. Kernan, Department of Physiology, University College Dublin, und seiner Mitarbeiterin Miss Mary MacDermott, Ph. D., die mich während eines Forschungsaufenthaltes in Dublin im Winterhalbjahr 1977/78 in die Arbeit mit ionenselektiven Elektroden einführten. Danken möchte ich auch dem Vorstand des Departments, Herrn Professor Murnaghan.
Meine Eltern und die Studienstiftung des deutschen Volkes ermöglichten diesen Aufenthalt in Irland ; ihnen sei hiermit herzlich gedankt.

Herrn Diplom-Physiker Horst Renner sei mein herzlicher Dank für mannigfaltige Unterstützung in Rat und Tat versichert.
Den Herren D. Weppert, C. Reinhard und J. Sauer danke ich für die Hilfsbereitschaft bei der Lösung technischer Fragen.

LEBENSLAUF

Am 9. November 1955 wurde ich in Bad Mergentheim geboren. Meine Eltern sind Harry Elsner, Studiendirektor am Berufsschulzentrum Tauberbischofsheim, und Anny Elsner, geborene Mohr, Oberlehrerin HHT an der Realschule Bad Mergentheim. Ich habe noch zwei jüngere Geschwister.

Von 1962 bis 1966 besuchte ich die Volksschule in der Au, von 1966 bis 1972 das Deutschorden-Gymnasium in Bad Mergentheim. 1972 wechselte ich an das Matthias-Grünewald-Gymnasium in Tauberbischofsheim, wo ich 1974 das Abitur ablegte.

1974 begann ich an der Julius-Maximilians-Universität in Würzburg das Studium der Medizin und der Philosophie. 1976 wechselte ich von der Philosophie zur katholischen Theologie.

Im Sommer 1976 bestand ich die Ärztliche Vorprüfung, 1977 den ersten Teil der Ärztlichen Prüfung.
Im Wintersemester 1977/78 befand ich mich zu einem Forschungsaufenthalt am Department of Physiology des University College Dublin.
Im Herbst 1979 legte ich die Vordiplomprüfung in katholischer Theologie ab, im Frühjahr 1980 den zweiten Teil der Ärztlichen Prüfung.
Danach absolvierte ich das Praktische Jahr und bestand im Mai 1981 den dritten Teil der Ärztlichen Prüfung.

Seit März 1979 bin ich mit Claudia Elsner, geborene Tausch, verheiratet.

Würzburg, den 15. Mai 1981

Peter Elsner

Druckerei A. Staudenraus Würzburg